

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1899-1900.

N° 17.

DE L'APPLICATION DE LA TYROSINASE,

Ferment oxydant du RUSSULA DELICA,

A L'ÉTUDE DES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES.

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 19 juillet 1900

PAR

HARLAY, Victor André

PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE,

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES,

EX-INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS,

LAURÉAT DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

(1^{er} PRIX DE MICROGRAPHIE, 1896. — PRIX MENIER, 1896)

JURY

MM. BOURQUELOT, Président.
PERROT, Chargé de cours.
GRIMBERT, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE & LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME*

1900



UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1899-1900.

N° 17.

DE L'APPLICATION DE LA TYROSINASE,

Ferment oxydant du RUSSULA DELICA,

A L'ÉTUDE DES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES.

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 19 juillet 1900

PAR

HARLAY, Victor André

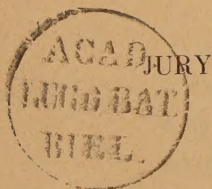
PHARMACIEN DE 1^{re} CLASSE,

LICENCIÉ ÈS-SCIENCES,

EX-INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS,

LAURÉAT DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

(1^{er} PRIX DE MICROGRAPHIE, 1896. — PRIX MENIER, 1896)



MM. BOURQUELOT, Président.
PERROT, Chargé de cours.
GRIMBERT, Agrégé.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE & LITHOGRAPHIE LUCIEN DECLUME

1900

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUIGNARD, Directeur, Membre de l'Institut, ✱, ☉ I.
A. MOISSAN, Assesseur, Membre de l'Institut, O✱, ☉ I.
E. MADOUÉ, Secrétaire, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. JUNGFLEISCH, ✱, ☉ I, . . . Chimie organique.
LE ROUX, O✱, ☉ I . . . Physique.
BOUCHARDAT, ✱, ☉ I, . . . Hydrologie et Minéralogie
PRUNIER, ☉ I. . . Pharmacie chimique.
MOISSAN, membre de l'Institut, O✱, ☉ I. . . Chimie minérale.
GUIGNARD, membre de l'Institut, ✱, ☉ I. . . Botanique générale.
VILLIERS-MORIAMÉ, ☉ I. . . Chimie analytique.
BOURQUELOT, ☉ I. . . Pharmacie galénique.
GAUTIER, ☉ A. . . Toxicologie.
PERROT, ☉ A, agrégé, chargé du cours . . . Cryptogamie.
N. . . Matière médicale.
N. . . Zoologie.

Directeur et professeur honoraire :

M. CHATIN, Membre de l'Institut, O✱, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BERTHELOT, Membre de l'Institut, G. C. ✱, ☉ .
MARCHAND, ☉ I; RICHE, O✱, ☉ I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. BERTHELOT, ☉ A.	MM. MOUREU.
OUVRARD, ☉ I.	COUTIÈRE.
RADAIS, ☉ A.	GRIMBERT.
LEBEAU, ☉ I,	PERROT. ☉ A.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. GUERBET . . . Chimie générale.
LEXTREIT, ☉ I. . . Chimie analytique.
GUÉRIN, ☉ A. . . Micrographie.
QUESNEVILLE, ☉ I. . . Physique.
LUTZ . . . Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. CHASTAING, ☉ I.

Bibliothécaire : M. DORVEAUX, ☉ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR EM. BOURQUELOT,

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE,

PHARMACIEN EN CHEF DE L'HÔPITAL LAENNEC,

Hommage de respect et de reconnaissance.

A MA FAMILLE

A MES AMIS

DE L'APPLICATION DE LA TYROSINASE

A L'ÉTUDE DES FERMENTS PROTÉOLYTIQUES

INTRODUCTION

Je n'ai pas eu l'intention, en abordant ce travail, d'approfondir l'étude de la composition et des transformations des albuminoïdes, ni de fouiller à fond l'action des ferments protéolytiques sur ces corps, ni même de réunir l'ensemble des connaissances actuellement acquises à la science sur ce vaste sujet. Dans le commerce, il existe des peptones médicinales obtenues par digestion pepsique, et des peptones pancréatiques. Distinguer les produits pepsiques et pancréatiques l'un de l'autre par des moyens simples et pratiques, tel est le point de départ de ce travail ; employer à cet effet un réactif spécial, un *réactif biologique*, telle en est l'originalité ; utiliser le même réactif pour l'étude de quelques faits concernant l'histoire des ferments protéolytiques, telle en est la tendance. Qu'il me soit permis d'exprimer ici ma profonde reconnaissance envers M. le Professeur Bourquelot, qui, non seulement m'a vivement recommandé ce sujet, et m'a admis à travailler dans ses laboratoires,

soit à l'hôpital Laënnec, soit à l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Paris, mais aussi, depuis déjà plusieurs années, m'a sans cesse guidé de ses conseils et soutenu de ses encouragements.

Dans l'étude de toute réaction, il faut toujours considérer :
1^o le corps que l'on veut soumettre à l'action d'un réactif donné ;
2^o le réactif lui-même. C'est pourquoi l'exposé des faits qui se rapportent aux réactions différentielles que j'ai plus spécialement étudiées, sera précédée de deux chapitres concernant, l'un, les produits des digestions pepsiques et pancréatiques, substances qui seront soumises au réactif, l'autre, le réactif, la *tyrosinase*, ferment soluble oxydant qui se rencontre dans plusieurs espèces de champignons, et en particulier dans le *Russula delica*. Le troisième chapitre se rapporte à la différenciation, par le moyen du ferment oxydant, des produits pepsiques et pancréatiques. Il sera suivi d'un quatrième chapitre dans lequel un autre ferment protéolytique, la papaïne, sera l'objet d'une étude particulière. Dans les cinquième et sixième chapitres j'emploierai la tyrosinase pour étudier l'action de la chaleur sur les ferments protéolytiques, et l'action de ces ferments l'un sur l'autre. Quoiqu'il ne soit pas difficile de se procurer le *Russula delica*, qui est un champignon assez répandu, les chimistes éprouveront peut-être quelque répugnance à emprunter au domaine de la botanique un réactif qu'il faut renouveler tous les ans. C'est pourquoi j'ai cherché à remplacer la tyrosinase par un réactif purement chimique ; et, au cours de mes essais, j'ai été amené à trouver une autre réaction des produits de digestion pancréatique, réaction non pas nouvelle, mais généralement peu connue, pouvant s'ajouter aux réactions que produit la tyrosinase, et, par suite, confirmer ou compléter les renseignements que nous donnait ce premier réactif : le septième cha-

pitre lui sera consacré. Dans un dernier chapitre, je tenterai en m'appuyant sur l'emploi des deux réactions étudiées précédemment, d'éclaircir un fait dont la cause est encore en controverse, l'autodigestion de la fibrine en milieu antiseptique.

Le sujet, tel que je l'ai traité, est à coup sûr loin d'être épuisé, et bien des points pourront être l'objet de recherches chimiques plus spéciales; mais je pense qu'au point de vue pharmaceutique, les deux réactions dont j'ai étudié les principales conditions de réalisation pourront être d'une certaine utilité.



CHAPITRE PREMIER

Des produits des digestions pepsiques et pancréatiques des albuminoïdes.

La digestion n'est qu'un cas particulier de la protéolyse, action par laquelle, sous diverses influences, les substances protéiques, insolubles ou non dialysables, subissent des modifications qui les rendent non seulement solubles et incoagulables, mais encore dialysables. Ces modifications sont très vraisemblablement produites dans tous les cas par fixation d'eau sur les albuminoïdes, et toute action protéolytique semble être protéohydrolytique. Aussi parmi les causes déterminant la protéolyse, se placent au premier rang les agents hydratants, tels que les acides plus ou moins dilués, à chaud (Erlenmeyer et Schæffer, Schutzenberger, Hlasiwetz et Habermann), les alcalis agissant également à chaud (Schutzenberger), et, moins rapidement, l'eau pure, soit à l'ébullition, soit sous pression (1).

Une autre cause déterminante de la protéolyse et non des moins importantes, soit qu'on l'étudie en elle-même, soit qu'on considère le rôle physiologique qu'elle joue, se rencontre dans l'action des ferments solubles protéolytiques, qui, chez les êtres vivants, digèrent les albuminoïdes, c'est-à-dire les transforment en substances directement assimilables. Les deux ferments protéolytiques les plus connus, les mieux étudiés, sont la pep-

(1) Voir la bibliographie dans Neumeister. Ueber die nächste Einwirkung gespannter Wasserdämpfe auf Proteine. *Ztschr. f. Biolog.*, XXVI, p.57, 1889.

Je ne donnerai pas ici les indications bibliographiques de tous les travaux cités, passés depuis longtemps dans le domaine de la science, mais seulement les indications des travaux plus récents, ou présentant, pour la suite de ce travail, un intérêt plus spécial.

sine et la trypsine : la première, secrétée par les glandes à pepsine qui tapissent la plus grande partie de la paroi stomacale, la seconde secrétée par les culs-de-sac glandulaires du pancréas. Tandis que la pepsine n'exerce son action sur les albuminoïdes qu'en milieu acide, et est inactive en milieu neutre ou alcalin, la trypsine digère les albuminoïdes en milieu neutre ou même alcalin et reste sans action en présence d'un acide minéral ; mais, qu'elle soit déterminée par l'un ou l'autre des ferments, la protéolyse n'en suit pas moins une marche analogue, au moins dans les premières phases ; par contre, l'analogie ne se poursuit pas dans les produits ultimes de la digestion, et, à cet égard, la trypsine se montre un agent destructeur de la molécule albuminoïde bien plus puissant que la pepsine. Nous allons considérer les différentes phases par lesquelles passe cette dislocation.

Si l'on place dans l'eau acidulée par 2 à 3/1000 HCl, quelques flocons de fibrine, on voit celle-ci se gonfler, devenir transparente, à tel point, si la fibrine est en suffisante quantité, qu'il se forme une gelée qui permet de retourner le flacon sans qu'il s'échappe de liquide. Mais si, à la gelée ainsi formée, on ajoute de la pepsine, la masse se fluidifie assez rapidement à froid, très-rapidement à la température de 40-50°, et bientôt elle se convertit en un liquide trouble, de moins en moins épais, où l'on voit nager quelques flocons de fibrine transparente, non encore dissoute. Au bout d'un certain temps, toute la fibrine a disparu. Le liquide devient plus fluide, et la substance qui le rendait trouble se dépose facilement, sous forme d'un précipité amorphe, grisâtre. Telle est la suite des phénomènes que l'on peut constater directement au cours de la digestion pepsique. En même temps, le liquide, si on essaie de le filtrer aux différentes phases de l'opération, passe de plus en plus facilement, et de plus en plus clair. Les produits en lesquels s'est ainsi transformée la fibrine ont été nommés, par Miahle, albuminoses, et, par Lehmann, peptones. Mais ni les produits, ni le mode d'action ne sont aussi simples que le croyait Miahle. Si, en effet, à la première phase de dissolution de la fibrine, on neutralise la liqueur, on constate qu'il se forme un précipité. Ce précipité n'est autre que la syntonine ou acide-albumine ; Meissner qui, le premier, a constaté le fait, nomma le précipité parapeptone :

il donna au résidu de digestion pepsique, non dissous, le nom de dyspeptone. La syntonine n'est pas un produit de digestion pepsique : sa formation peut être attribuée à l'acide chlorhydrique du suc gastrique ; en effet Brücke a fait remarquer qu'on pouvait l'obtenir par simple action des acides dilués sur la fibrine. Si, après avoir précipité la syntonine dans le liquide, on le porte à l'ébullition, il se produit un coagulum dû, d'après Arthus et Huber (1), à la dissolution de la fibrine, sans modification, dans ses produits de digestion pepsique.

Au bout d'un temps suffisant de digestion, il n'est plus possible, comme l'a constaté pour la première fois Mülder, d'obtenir de précipité par neutralisation du liquide. Alors l'albuminoïde en solution est transformé en ce que Meissner nomme à son tour peptones. Ces peptones ne sont pas une seule substance, car Meissner lui-même a pu les diviser en trois fractions, l'une précipitable par l'acide azotique et par le ferrocyanure acétique ; une deuxième, par le ferrocyanure acétique seul ; la troisième, non précipitable par ces réactifs. Schmidt-Mülheim a divisé les peptones de Meissner en deux substances ou groupes de substances, la propeptone, précipitable par le chlorure de sodium à saturation, en milieu acide, et la peptone vraie, non précipitable ; la peptone de Schmidt-Mülheim n'est pas précipitable par le ferrocyanure acétique. La propeptone de Schmidt-Mülheim n'est pas elle-même pas une substance unique, c'est un groupe de substances que l'on a désignées depuis sous le nom d'albumoses ou de protéoses. En effet, Kühne et Chittenden ont séparé ces albumoses en deux albumoses primaires, et en une albumose secondaire ou deutéroalbumose, les premières étant précipitables par le chlorure de sodium à saturation, en milieu neutre, la seconde étant précipitable par le chlorure de sodium en milieu acide. Ils ont de nouveau divisé les albumoses primaires en proto—, et hétéro-albumose, la première soluble dans l'eau pure, la seconde insoluble dans l'eau pure, soluble dans les solutions salines diluées, et, par suite, précipitable par dialyse de ses solutions salines. Cette dernière est susceptible, soit par long contact avec l'eau, soit par action de la

(1) Arthus et Huber. *Arch. de Physiol.*, 1893, p. 447 ; d'après A. Gautier et Arthus. *Leçons de chimie biologique*. Paris 1897, p. 526.

chaleur, ou par dessiccation, de se transformer en une modification insoluble, non seulement dans l'eau, mais aussi dans les solutions salines diluées. C'est la dysalbumose. La deutéroalbumose est soluble dans l'eau pure. Ce n'est pas tout. E. Pick (1) appliqua à l'étude des albumoses une méthode déjà employée par Hofmeister et ses élèves, Kauder, Pohl, Lewith et Reye, la méthode de précipitation fractionnée par le sulfate d'ammoniaque; il parvint à séparer quatre portions : l'une précipitable par demi-saturation, par le sulfate d'ammoniaque, du liquide de digestion neutralisé; cette portion correspond aux albumoses primaires et peut être distinguée par la dialyse en proto-, et hétéroalbumose. La seconde portion, précipitable par saturation aux 2/3 par le sulfate d'ammoniaque, est la deutéroalbumose A. Une deutéroalbumose B est précipitable par saturation complète et une deutéroalbumose C, par acidification du liquide neutre saturé de sulfate d'ammoniaque. D'autre part il divise en deux les peptones non précipitées par ce procédé; la peptone A, insoluble dans l'alcool, la peptone B soluble.

Baumann et Bömer (2) ayant reconnu que le sulfate de zinc à saturation, en milieu acide, précipite totalement les albumoses, Zunz (3) entreprit leur précipitation fractionnée par ce sel et arriva aux mêmes résultats que Pick. Il obtint 4 fractions possédant les propriétés des différentes albumoses isolées par Pick. Parmi tous ces produits, quels sont ceux qui se forment en première ligne? L'école de Kühne, et particulièrement Neumeister, admet que les albumoses primaires se forment d'abord, et, dérivant de celles-ci, les albumoses secondaires, puis les peptones. Pick (4) a étudié dernièrement cette question et a constaté que les albumoses dites primaires ne constituent

(1) Ein neues Verfahren zur Trennung von Albumosen und Peptonen; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXIV, p. 246, 1897.

(2) Ueber die Fällung der Albumosen durch Zinkulfat; *Ztschr. f. Untersuch. d. Nahr- u. Genussmittel*; I, p. 106, 1898.

(3) Die fractionirte Abscheidung der peptischen Verdauungsprodukte mittelst Zinksulfat; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXVII, p. 219, 1899.

(4) Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXVIII, p. 219, 1899.

pas exactement les produits vraiment primaires de la digestion. Il démontre en effet qu'avec la protoalbumose et l'hétéroalbumose, qui dérivent isolément de la fibrine, sans dépendre l'une de l'autre, se produit la deutéroalbumose B.

Si l'on réunit par groupes la grande quantité des corps ainsi découverts peu à peu, on peut considérer trois phases dans l'action pepsique : phase syntonine, phase albumoses, phase peptones. L'action digestive ne semble pas se poursuivre au delà de la formation de ce dernier terme, et la molécule albuminoïde n'est désagrégée qu'en fragments qui, tous, jouissent des propriétés fondamentales des albuminoïdes et, notamment, donnent la réaction du biuret. Cependant plusieurs auteurs ont soutenu qu'à la longue, dans ce dédoublement, pouvaient se former des produits cristallisés, des acides amidés, la leucine et la tyrosine. En effet, Lubavin (1) dit qu'une bonne pepsine peut donner ces deux produits : Hoppe-Seyler (2) soutient la même opinion. Depuis, Richet (3) a confirmé la formation de tyrosine par digestion pepsique. Kühne (4), au contraire, soutient que la peptone est le terme final de la digestion pepsique, et si Hoppe-Seyler a trouvé, dans les digestions pepsiques, de la leucine et de la tyrosine, cela tient à la présence, dans la pepsine, d'impuretés provenant de la muqueuse stomacale. Neumeister (5) appuie l'opinion de Kühne et constate que, dans les digestions opérées par un suc gastrique artificiel obtenu avec la muqueuse stomacale, on trouve du tryptophane, substance de nature encore mal connue, sur laquelle nous reviendrons ailleurs, mais qui, *toujours*, d'après Neumeister, accompagne la production de tyrosine. Si, au contraire, pour l'essai de digestion, on emploie une pepsine purifiée, on n'obtient pas de tryptophane, donc pas de tyrosine. Hugo Winternitz (6) inter-

(1) *Med. chem. Untersuch. Von Hoppe-Seyler*, IV, p. 463-485.

(2) *Physiol. Chemie*, Bd. II, p. 228.

(3) *Du suc gastrique chez l'homme et les animaux*. Paris, 1878.

(4) *Verhandl. d. naturhist. medic. Vereins zu Heidelberg*, N. F., Bd. I, Heft 3, cité par Neumeister.

(5) Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone ; *Ztschr. f. Biologie*, XXVI, p. 324, 1889.

(6) Ueber das Verhalten der Milch bei der Fäulniss ; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XVI, p. 460, 1892.

prête autrement ce fait. Pour lui, il se produit, quand on purifie la pepsine, un affaiblissement de son activité digestive, et, si la muqueuse stomacale produit de la tyrosine, c'est que la pepsine qu'elle contient agit normalement d'une façon plus énergique que les pepsines qu'on en peut extraire. Hirschler (1) a essayé d'apporter une preuve en faveur de l'opinion de Hoppe-Seyler en démontrant que plus on prolonge une digestion pepsique, plus augmente la proportion d'azote attribuable aux substances non précipitables par l'acide phosphotungstique. En admettant, comme le croit Hirschler, que les albumoses et les peptones sont complètement précipitées par l'acide phosphotungstique, cette remarque indiquerait une augmentation de la proportion des produits azotés cristallisables, de la nature de la leucine et de la tyrosine. Toutefois, Hirschler n'a pu isoler ces corps en nature. D'autre part, Neumeister a fait ressortir le non-fondé des expériences de Hirschler en démontrant que de faibles proportions de deutéroalbumoses échappent à la précipitation phosphotungstique et que les peptones elles-mêmes ne sont qu'incomplètement précipitées. La séparation de tyrosine par l'action pepsique reste donc douteuse, et en tous cas la production de ce corps paraît être des plus faibles, même dans les circonstances les plus favorables. Il n'en est plus de même si l'on considère la protéolyse trypsique.

Mais avant de passer à l'étude de la digestion trypsique, je dois mentionner les principaux points d'une hypothèse conçue par Kühne, dans le but d'expliquer certains faits relatifs à cette digestion. Kühne et Chittenden admettent que l'albuminoïde est formé de l'union de deux groupes, l'*anti-groupe* et l'*hémigroupe*. Le premier effet de l'action pepsique est le déboulement de l'albuminoïde en deux substances, hémialbumine et antialbumine, qui subissent ensuite des hydratations successives, donnant naissance aux albumoses, antialbumose (probablement un mélange) et hémialbumoses (divisibles en proto-, hétéro-, deutéroalbumoses). Les hémialbumoses s'hydratent rapidement et donnent une ou plusieurs hémipeptones. L'antialbumose, plus difficilement attaquant, donne plus lentement

(1) Cité par Neumeister (*l. c.*)

de l'anti-peptone. Le mélange des deux sortes de peptones produites (anti-et hémi-) constituerait la peptone pepsique ou amphopeptone. Là s'arrête l'action de la pepsine. Nous allons voir que l'action de la trypsine est plus profonde.

Si l'on met de la fibrine dans une solution de pancréatine neutre ou alcalinisée par 0,5 0/0 de carbonate de soude, on constate qu'au bout d'un certain temps, variable suivant la température et la quantité de pancréatine employées, les flocons de fibrine se désagrègent sur les bords et peu à peu finissent par se dissoudre, sans se gonfler cependant, en laissant un résidu grisâtre, insoluble, de dyspeptone. Si l'on chauffe le liquide au début de l'action, il se produit un coagulum, dû d'après Herrmann à la présence de 2 globulines produites par dédoublement de la fibrine. Suivant Arthus et Huber, il n'y a là, comme dans la digestion pepsique, que dissolution de la fibrine dans ses produits de digestion. Ces produits de digestion, non coagulables, seraient d'abord une propeptone, qui d'après Otto serait identique avec les produits correspondants de digestion pepsique. Mais en réalité, ici encore, il se produit un mélange d'albumoses, séparables en proto-, hétéro-, deutéroalbumoses. Celles-ci se transforment ensuite en peptones. Mais l'action ne s'arrête pas là ; après formation des peptones, amphopeptone de Kühne, mélange d'hémipeptone et d'anti-peptone, l'hémipeptone subit un dédoublement dont les produits sont la tyrosine et la leucine, ainsi que l'a reconnu Kühne pour la première fois. L'anti-peptone, selon Kühne, résiste à la digestion trypsique. Les produits ultimes de cette action seraient donc l'anti-peptone, la leucine, la tyrosine, auxquels il faut ajouter l'acide aspartique, isolé par Salkowski et Radziejewski, l'acide glutamique trouvé pour la première fois par Knieriem dans les produits de digestion pancréatique des albuminoïdes végétaux, l'ammoniaque trouvée par Hirschler et par Stadelmann, l'hypoxanthine et la xanthine, signalées par G. Salomon, et enfin le tryptophane, découvert par Tiedemann et Gmelin dans le suc pancréatique du chien. Mais actuellement la question de l'existence de l'anti-peptone est très controversée. Tandis que, pour Kühne, l'anti-peptone paraît être un mélange

de corps de nature peptonique, Siegfried (1) et Balke la considèrent comme une substance unique, non albuminoïde, et, par suite, ne pouvant être digérée par les ferments digestifs, donnant d'ailleurs la réaction du biuret et identique à l'acide carnique, substance isolée par Siegfried dans les extraits de viande. Pour Kutscher (2), l'antipeptone n'existe pas; le produit désigné sous le nom d'antipeptone de Kühne, obtenu par précipitation alcoolique d'un liquide de digestion trypsique avancée, dont on a éliminé les albumoses par le sulfate d'ammoniaque, peut être considéré comme un mélange des bases hexoniques découvertes par Schulze, Drechsel, Hedin, Kossel; savoir, l'arginine, l'histidine, la lysine, celle-ci déjà caractérisée par Hedin dans les produits de digestion pancréatique, celles-là trouvées par lui dans les produits de destruction des albuminoïdes par l'acide chlorhydrique en présence d'un peu d'étain. Ces bases sont accompagnées, dans la prétendue antipeptone, de traces de tyrosine, leucine, acide glutamique... Il y aurait ainsi destruction complète de la molécule albuminoïde par l'action de la trypsine, dislocation que Kutscher compare à celle opérée par l'acide sulfurique concentré (Hedin). Quant à la réaction du biuret, attribuée par Kühne à l'antipeptone, elle serait, d'après Kutscher, due à des substances n'existant qu'à l'état de trace dans le mélange antipeptone; par digestion suffisamment prolongée, elle disparaîtrait même totalement, ainsi que d'ailleurs l'avaient déjà remarqué Morochowetz et Laurow (3). La digestion trypsique intensive aurait donc pour effet une destruction totale des albuminoïdes. Il faut cependant faire observer que tel n'est pas le cas, pratiquement. Les auteurs précités opéraient avec des pancréas soumis à l'autodigestion à 30-40°, pendant 1 à 5 mois, en présence de chloroforme et de thymol. Or, ni la quantité du ferment, ni la durée du temps de digestion ne correspondent aux conditions ordinaires de digestion réalisées dans la fabrication des peptones. Dans ces dernières conditions, le terme

(1) Ueber Antipepton; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXVII, p. 335, 1899.

(2) Die Endprodukte der Trypsinverdauung. Thèse inaugurale, Strasbourg, 1899.

(3) Zur Kenntniss des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe: *Ztsch. f. physiol. Chem.*, XXVI, p. 513, 1898.

peptone n'est pas détruit, et pratiquement on peut s'en tenir à l'opinion de Kühne, que les produits ultimes de la digestion pancréatique sont constitués par des peptones d'une part, et d'autre part, par des produits tels que la leucine, la tyrosine, l'ammoniaque, l'acide aspartique..., le tryptophane.

Avec la plupart des albuminoïdes, les produits des digestions pepsiques et pancréatiques sont, sinon les mêmes, du moins tout à fait analogues. Les produits de digestion de l'albumine de l'œuf passent en effet par une phase albumose ; on obtient avec la globuline, des globuloses ; avec la caséine, des caséoses ; avec la vitelline, des vitelloses ; et, dans tous ces produits, on peut distinguer des hétéro-, proto-, deutéroalbumoses, d'où se forment ensuite les peptones. De même, avec les albumoïdes, on obtient aussi des albumoses (élastoses, dérivant de l'élastine, gélatoses dérivant de la gélatine...). Mais les substances collagènes telles que la gélatine et l'élastine ne donnent pas de tyrosine par digestion pancréatique. Pour la gélatine en particulier, Nencki n'a obtenu par digestion pancréatique, avec de la gélatine-peptone, que de l'ammoniaque, de la leucine, du glyocolle. Wälchli, avec l'élastine, n'obtint pas de tyrosine, mais du glyocolle, de la leucine, de l'ammoniaque et de l'acide valériannique.

Etant données ces vues d'ensemble sur les processus digestifs pepsiques et pancréatiques, quel profit peut-on en tirer pour tenter une différenciation des peptones médicinales pancréatiques ou pepsiques ? Dans la préparation de la peptone médicinale (peptone pepsique) telle que la prescrit le Codex (Supplément, 1895), on met digérer 6 à 8 heures à 50°, de la viande de bœuf désossée, dégraissée, divisée en menus fragments, dans une solution chlorhydrique de pepsine. L'opération est terminée quand 10° du liquide filtré et refroidi ne troublent plus par addition de trente gouttes d'acide azotique officinal. On filtre et on sature par le bicarbonate de soude, puis on évapore à siccité. L'essai de ce produit, mentionné à la suite de la préparation, consiste à soumettre une solution de la peptone, d'une part à l'action de la chaleur, d'autre part à l'addition d'acide azotique : il ne doit se produire ni coagulation, ni trouble. La peptone doit de plus donner la réaction du biuret (couleur violet-pour-

pre par addition à sa solution, alcalinisée par la soude, de quelques gouttes de solution de sulfate de cuivre à 2 o/o). Cette réaction d'identité est illusoire : elle se produit avec tous les albuminoïdes et n'indique la présence d'une peptone dans un liquide que lorsqu'on a éliminé de ce liquide tout ce qui n'est pas peptone. Quant aux deux autres réaction, elles indiquent que la digestion de la chair musculaire a dépassé la phase syntonine et la phase albumoses.

Pour ce qui est des peptones médicinales pancréatiques, non mentionnées au Codex, elles doivent répondre évidemment aux mêmes conditions, c'est-à-dire qu'on doit pousser la digestion jusqu'au terme de non-précipitation par l'acide azotique, comme d'ailleurs le prescrit le Supplément du Codex à propos de l'essai de la pancréatine. Si, pour distinguer les peptones médicinales pepsiques des produits pancréatiques correspondants, on cherche des différences dans les propriétés comparées des corps formés au cours des deux digestions, on se trouve embarrassé. En effet Otto (1) a prouvé qu'il n'y a pas de différence entre les compositions des albumoses pancréatiques et des albumoses pepsiques, ni entre celles des peptones pancréatiques et des peptones pepsiques. Les réactions de coloration et de précipitation sont aussi les mêmes pour ces deux groupes de corps ; mais si, ni la composition, ni les réactifs, ne peuvent donner d'indication, il en est autrement des propriétés optiques. J. Béchamp (2) a trouvé que, lorsque les matières albuminoïdes sont digérées par le pancréas, leur pouvoir rotatoire baisse davantage que lorsque ces mêmes matières sont digérées par le suc gastrique. Otto a bien constaté, que, isolées à l'état de pureté, les deux peptones ont le même pouvoir rotatoire ($-65^{\circ},5$) ; et il semblerait d'après cette observation que l'examen polarimétrique ne pût servir à distinguer les deux produits de digestion ; mais il faut bien remarquer que, quand on s'adresse aux peptones médicinales, on s'adresse, non à une substance unique, mais à un ensemble de produits de digestion.

(1) Beiträge zur Kenntniss der Umwandlung von Eiweissstoffen durch Pankreasferment ; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, VIII, p. 129, 1884.

(2) Recherches sur les albumoses pancréatiques ; *C. R. Acad. Sc.*, XCIV, p. 883, 1872.

Dans la peptonisation pancréatique poussée jusqu'au terme de non-précipitation par l'acide azotique, il s'est formé déjà de la leucine et de la tyrosine, produits de dédoublement avancé de l'abuminoïde, et, tandis que dans la digestion pepsique, selon Kühne, on n'obtient que des corps peptoniques, dans la digestion pancréatique, par contre, l'hémipeptone est déjà plus ou moins attaquée et transformée en corps de pouvoir rotatoire plus faible, tels que la tyrosine (en solution chlorhydrique $\alpha_D = -7^\circ,98$; en solution potassique $\alpha_D = -9^\circ,01$).

En effet, si on compare des digestions pepsiques et pancréatiques de fibrine, faites deux à deux dans les mêmes conditions avec 30 gr. de fibrine fraîche essorée pour 150 gr. de liquide, et à des températures comprises entre 45 et 50°, on constate qu'au moment où les liquides cessent de se troubler par l'acide azotique, les rotations observées au polarimètre, en tube de 20 cm. ont les valeurs suivantes (1) :

Digestions pepsiques	$-5^\circ 22'$	$-6^\circ 24'$	$-6^\circ 22'$
— pancréatiques.....	$-3^\circ 6'$	$-3^\circ 16'$	$-3^\circ 28'$
Rapport des rotations pepsiques aux rotations pancréatiques	1,73	1,96	1,83

Avec l'albumine coagulée les résultats sont analogues :

Proportion d'albumine employée, 40 gr. pour 200 de liquide.	Quantité correspondant à la même proportion de matière sèche que pour la fibrine.		
Digestions pepsiques	$-3^\circ 12'$	$-3^\circ 12'$	$-6^\circ 8'$
Digestions pancréatiques.....	-1°	$-1^\circ 10'$	$-2^\circ 18'$
Rapport	3,20	2,91	2,66

Enfin, entre les peptones de viande, pepsiques et pancréatiques, il existe une différence dans le même sens.

Deux peptones pepsiques du commerce reconnues comme telles, grâce aux réactions dont je parlerai plus loin, ont donné

(1) Les quantités de substances dissoutes sont d'ailleurs à très peu de chose près égales. En effet pour 40 gr. de fibrine fraîche renfermant 11 gr. 80 de matière sèche, le résidu insoluble de la digestion pancréatique menée jusqu'à non précipitation azotique a été déterminé égal à 1 gr. 62, alors que pour 40 gr. de fibrine fraîche renfermant 13 gr. 12 de matière sèche, le résidu de digestion pepsique était de 1 gr. 53.

en solution à 2 g. pour 100^{cc}, une déviation de -2° et de $-2^{\circ}2'$. Les pouvoirs rotatoires, calculés d'après ces données, étaient -50° et $-50^{\circ},83$. Une peptone pancréatique du commerce, donnée et reconnue comme telle, a produit dans les mêmes conditions une rotation de $-1^{\circ}28'$ (pouvoir rotatoire $-36^{\circ},66$). Les rapports qui existent entre ces valeurs sont 1,36 et 1,38.

On voit donc que si l'observation de Béchamp n'est pas juste quand on s'adresse aux peptones vraies, isolées, pures, elle peut trouver néanmoins son application dans l'examen des peptones médicinales, qui sont, en tout cas, des mélanges. Mais, comme le prouvent les valeurs diverses des rapports signalés plus haut, il est impossible de donner des chiffres exacts en ce sens. La raison en est qu'à côté des variations imputables à la matière employée (chair musculaire) il s'en rencontre d'autres, dues à la difficulté de saisir exactement le terme auquel on doit arrêter la digestion. Si l'on reste en deçà du terme prescrit, c'est-à-dire si on arrête la digestion alors que l'acide azotique produit encore avec les liquides de digestion une très faible opalescence, il est évident que le pouvoir rotatoire de la peptone médicinale sera plus élevé, l'attaque des albuminoïdes étant poussée moins loin. Il paraît par contre vraisemblable au premier abord que, dans les digestions pepsiques continuées au delà du terme prescrit, le pouvoir rotatoire doive atteindre une limite minima, les albumoses étant alors complètement transformées en peptones. J'ai reconnu qu'il n'en était rien.

Deux digestions pepsiques ont été menées comparativement avec

Fibrine essorée.....	30 gr.
Pepsine médicinale.....	1 gr. 50
Acide chlorhydrique officinal.....	1 gr. 50
Eau distillée chloroformée.....	150 gr.

Les deux flacons contenant ces substances ont été chauffés au bain-marie à $45-50^{\circ}$ jusqu'à ce que le liquide filtré et refroidi ne précipitât plus par l'acide azotique, c'est-à-dire, effectivement, pendant 6 heures. Les deux liquides furent filtrés, puis l'un d'eux fut neutralisé par addition d'un excès de carbonate de chaux, porté à l'ébullition et filtré de nouveau. Après addi-

tion de chloroforme, les deux liquides furent laissés en repos deux jours à la température du laboratoire. Des essais polarimétriques faits de deux en deux jours, à partir du second jour après la filtration, donnèrent les résultats suivants. Dans le liquide neutralisé et bouilli, la déviation observée dans le premier examen ne change pas par la suite. Elle est de $-5^{\circ}22'$. Dans le liquide non bouilli, la déviation subit en 12 jours une diminution progressive : de $-5^{\circ}52'$, sa valeur initiale, elle devient $-5^{\circ}26'$.

J'ai contrôlé ces résultats par un 2^e essai. Le liquide, filtré au moment où il ne troublait plus par l'acide azotique, a été divisé en deux parts : l'une fut soumise à l'ébullition, puis filtrée après remplacement de l'eau évaporée ; l'autre partie fut laissée telle quelle. Les deux liquides ont été additionnés de chloroforme et abandonnés à la température du laboratoire. L'examen polarimétrique fut fait de deux en deux jours. Pour réaliser les mêmes conditions dans l'examen des liquides, bouilli et non bouilli, on prélevait à chaque fois une prise d'essai de 30^{cc} environ ; on la portait à l'ébullition, dans un vase taré ; on remplaçait l'eau évaporée et on filtrait après refroidissement. Les résultats obtenus furent les suivants : avec le liquide bouilli, pas de changement dans la déviation observée le premier jour ($-6^{\circ}24'$) ; au contraire, les prises d'essai du liquide non bouilli ont déterminé des déviations d'amplitude progressivement décroissante. La déviation, de $-6^{\circ}16'$ au premier jour, s'est abaissée en 10 jours à $-5^{\circ}46'$.

Des recherches analogues ont été faites avec l'albumine coagulée. Celle-ci était préparée suivant la méthode indiquée dans la pharmacopée anglaise pour l'essai de la pepsine. Des œufs sont cuits par immersion de 1/4 d'heure dans l'eau bouillante et plongés ensuite dans l'eau froide. On en sépare le blanc qu'on lave avec un peu d'eau, et qu'on essore ensuite avec un linge propre ; on le pulpe au travers d'un tamis de crin. Des digestions pepsiques ont été faites avec l'albumine ainsi préparée, aux mêmes doses que pour les digestions pepsiques de fibrine. Après sept heures de séjour à 45-50°, on obtint un liquide non précipitable par l'acide azotique. Celui-ci fut filtré et divisé en deux parties dont l'une fut soumise à l'ébullition pour détruire

la pepsine. Les deux liquides ayant été examinés au polarimètre, de deux jours en deux jours, on put constater que, tandis que le liquide bouilli produisait toujours la même rotation ($-3^{\circ}12'$), la déviation s'était progressivement abaissée, pour le liquide non bouilli, en 12 jours, de $-3^{\circ}6'$ à $-2^{\circ}56'$.

On ne peut expliquer ce fait qu'en admettant que l'acide azotique ne précipite pas exactement toutes les albumoses, et qu'il en peut rester dans le liquide essayé, même alors que l'acide azotique ne donne plus aucun précipité. Ces albumoses, se transformant par la suite en peptones, voient diminuer leur pouvoir rotatoire. En effet Neumeister (1) a signalé l'acide azotique comme ne précipitant qu'incomplètement les albumoses. Selon lui, en l'absence de sels, même dans les solutions de deutéroalbumoses les plus concentrées, l'acide azotique ne produit aucun trouble. Par contre, même en l'absence de sel, les albumoses primaires, pourvu qu'elles soient à une concentration supérieure à 3 %, sont précipitées par l'acide azotique. Neumeister recommande pour l'emploi de l'acide azotique, la saturation préalable de la liqueur par le sel marin. On arrive ainsi à précipiter la presque totalité des deutéroalbumoses.

Nous voyons donc que le fait de pousser une digestion pepsique au-delà du terme de non-précipitation par l'acide azotique a une influence sur le pouvoir rotatoire des substances en solution et en provoque la décroissance. A plus forte raison en est-il de même avec les produits de digestion pancréatique, puisque, par la suite de la digestion, l'hémipectone formée, non précipitable par l'acide azotique, se détruit en produits de doublement plus simples. En effet, si l'on renouvelle avec des liquides de digestion pancréatique les essais déjà faits sur les liquides pepsiques, on arrive à des résultats de même ordre.

Deux digestions pancréatiques de fibrine ont été conduites parallèlement avec

Fibrine essorée.....	30 gr.
Pancréatine.....	0 gr. 60
Eau distillée chloroformée.....	150 gr.

Après digestion de 6 h. $1/2$ à $45-50^{\circ}$ dans le même bain-marie, les liquides, après filtration et refroidissement, ne trou-

(1) *L. c.*

blaient plus par l'acide azotique. Les deux liquides ont été filtrés; l'un a été abandonné à la température du laboratoire, l'autre a été au préalable chauffé à 100°, de façon à détruire la trypsine; les liquides ont été additionnés de chloroforme pour empêcher l'intervention des microorganismes. Au bout de 20 heures environ, le liquide non bouilli s'est troublé; il s'est formé des flocons blancs qui se sont peu à peu déposés. Ce dépôt a augmenté dans les jours qui suivirent, au point d'occuper moitié du volume du liquide. Examiné au microscope, il s'est montré formé uniquement de cristaux de tyrosine. Au bout de 10 jours, on a pu séparer par filtration, lavage avec quelques centimètres cubes d'eau distillée, puis à l'alcool à 95°, 0 gr. 20 de tyrosine pure provenant de la digestion de 30 gr. de fibrine (1). Par contre, le liquide bouilli est resté limpide.

En même temps que se formait la tyrosine, le pouvoir rotatoire du liquide baissait progressivement; en 12 jours, la déviation observée en tube de 20 ctm. s'est abaissée de -3° (trois jours après la filtration) jusqu'à $-2^\circ 48'$ (quinze jours après la filtration.) Le liquide bouilli a toujours produit la même déviation ($-3^\circ 6'$) dans le même intervalle de temps.

Dans un autre essai, le liquide de digestion, filtré au moment où il ne troublait plus par l'acide azotique, fut divisé en deux parties. L'une était abandonnée à elle-même, après addition d'un peu de chloroforme; l'autre fut portée à l'ébullition, filtrée et chloroformée. Les examens polarimétriques commencés dès le lendemain, ont été répétés 5 fois de deux en deux jours. La déviation observée avec le liquide bouilli ne varia pas ($-3^\circ 16'$); pendant ce temps, les déviations produites par l'autre liquide s'échelonnèrent de $-3^\circ 4'$ à $-2^\circ 46'$; et il s'y déposait, en même temps, de la tyrosine.

(1) On peut baser sur cette observation, et en suivant le procédé indiqué, un mode simple de préparation de petites quantités de tyrosine pure, la leucine formée restant dissoute dans le liquide. Kühne a indiqué une méthode un peu plus complexe: les produits de digestion de la fibrine par un pancréas frais sont traités par l'alcool, qui, précipitant les peptones, dissout la leucine et la tyrosine. La solution alcoolique concentrée laisse cristalliser la leucine et la tyrosine, que l'on sépare par cristallisation dans l'eau. Par ce procédé Kühne a pu obtenir 3,9 de tyrosine pour 100 de fibrine sèche. Le procédé que j'indique, plus simple, donne un rendement d'environ 2 %.

Avec l'albumine coagulée, on arriva au même résultat, avec cette différence que, l'albumine étant moins facilement dissoute que la fibrine par la pancréatine, il se produit pendant longtemps un faible trouble par addition d'acide azotique au liquide de digestion ; le trouble est faible parce que la phase de peptonisation se produit plus rapidement que la phase de transformation ou de dissolution de l'albumine.

En somme, ces quelques observations prouvent assez nettement que l'on ne peut pas fixer de chiffre exact pour les pouvoirs rotatoires des peptones médicinales ; mais ils prouvent aussi que toujours les peptones médicinales pepsiques ont un pouvoir rotatoire plus élevé que les peptones médicinales pancréatiques. La différence s'exagère si la digestion est fortement prolongée. J'ai pu, en effet, en faisant digérer 6 gr. de fibrine, desséchée à 40° et pulvérisée, dans 114 g. d'un liquide digestif contenant 0 g. 40 de pancréatine, et en prolongeant la digestion pendant près de 6 mois à la température de 40°, obtenir une peptone pancréatique de pouvoir rotatoire $-17^{\circ},03$, tandis que la peptone pepsique obtenue par une digestion de même durée possédait un pouvoir rotatoire de $-51^{\circ},17$.

Mais les différences pouvant n'être pas toujours aussi marquées, on se trouve obligé de rechercher une autre méthode de distinction des peptones pepsiques et pancréatiques, pouvant remplacer ou s'adjoindre à l'examen polarimétrique de ces produits. Mes tentatives dans ce sens ont eu comme point de départ la présence de la tyrosine dans les produits de digestion pancréatique des albuminoïdes.

CHAPITRE II

Le réactif **Russula delica.**

Il est bien connu que la molécule albuminoïde renferme des groupes aromatiques. La présence de tyrosine dans les produits de destruction profonde des albuminoïdes en est une preuve suffisante ; une autre preuve en est dans la formation, par putréfaction, de corps de la série aromatique, accompagnant la tyrosine, tels que : indol (Nencki, Kühne), scatol (Brieger), acides scatolcarbonique (E. et H. Salkowski), scatolacétique (E. Salkowski), phénylacétique et phénylpropionique (E. et H. Salkowski), phénol (Baumann)..... Par désagrégation plus ou moins complète de l'albuminoïde, certains de ces corps, la tyrosine notamment, pour les digestions trypsiques, peuvent être mis en liberté. Si l'on essaie alors sur les produits de destruction, ou de digestion des albuminoïdes, l'action d'un réactif général des dérivés phénoliques, il pourra se faire que, suivant le mode de digestion ou de destruction, les divers groupes mis en liberté déterminent des réactions diverses. Plus particulièrement, on peut espérer arriver ainsi à une différenciation des produits des digestions pepsiques et pancréatiques. Les ferments oxydants, dont l'action sur les phénols et leurs dérivés a été étudiée par MM. Bourquelot et Bertrand, sont ainsi tout naturellement indiqués, et plus spécialement parmi eux, la tyrosinase, dont l'action, plus générale d'ailleurs, peut se manifester sur la tyrosine, un des produits de digestion trypsique. Avant d'examiner l'application de ce réactif à l'étude des digestions, voyons quelle est son histoire, de quelle matière première on peut le retirer, et quel est son mode de préparation.

Les premiers faits relatifs aux ferments oxydants ont été

signalés par Schœnbein, qui, quoiqu'il n'ait pas prononcé le mot de ferment, avait cependant l'idée de leur existence et de leur mode d'action. Il constata que certaines substances organiques pouvaient fixer l'oxygène de l'air sur divers composés, en rendant cet oxygène plus actif, plus oxydant, probablement par transformation en ozone. C'est ainsi qu'un champignon, le *Boletus luridus* Sch., qui bleuit lorsqu'on le casse, contiendrait, à côté d'un chromogène particulier, se colorant en bleu par oxydation, une de ces substances transformant l'oxygène en ozone (1). Des substances oxydantes sont également contenues dans divers végétaux : *Senecio vulgaris* L., *Lactuca sativa* L., *Taraxacum dens-leonis* Desf., dont le suc bleuit énergiquement la teinture de gaïac (2). Schœnbein nommait ces substances *Sauerstofferreger*, *matières excitatrices de l'oxygène*, et reconnaissait qu'elles perdaient leurs propriétés sous l'action de la lumière, et par la chaleur.

En 1883, d'autre part, Hikorokuro Yoshida (3) reconnut la présence dans le latex de l'arbre à laque, d'un ferment soluble, et d'un corps qu'il crut être de nature acide, l'acide urushique ; celui-ci serait transformé, par action du ferment, en présence de l'air, en acide oxyurushique, noir. Si l'on chauffe le latex à 63°, il perd ses propriétés oxydantes.

M. G. Bertrand reprit cette étude (4), et, par traitement alcoolique du latex, put obtenir, en solution alcoolique le chromogène, qu'il nomma laccol, et dans le précipité, à l'état de mélange, le ferment oxydant, destructible à l'ébullition, auquel il donna le nom de laccase. Le laccol s'oxyde à l'air, en devenant rougeâtre, et plus rapidement en présence des alcalis : il devient alors noir. Ces propriétés le rapprochent des phénols polyatomiques, et, fait intéressant, la laccase, qui détermine rapidement, au contact de l'air, l'oxydation du laccol, oxyde de même divers phénols polyatomiques (pyrogallol, hydroquinone.....)

(1) Ueber die Selbstbläuung einiger Pilze, und das Vorkommen von Sauerstofferregern und Sauerstoffträgern in der Pflanzenwelt ; *Verhandl. d. Naturforschenden Ges. in Basel*, 1856, p. 339, 3 Hef.

(2) *J. f. prakt. Chem.* ; XV, p. 198, 1868.

(3) *Chemistry of Lacquer* (urushi) ; *J. of the Chem. Soc.* ; XLIII, p. 472, 1883.

(4) *Bull. Soc. chim. Paris* ; XI, p. 717, 1894 ; et XIII, p. 361, 1895.

avec production de colorations diverses. La laccase oxyde également avec coloration bleue, l'émulsion de résine de gaïac, qui peut ainsi servir de réactif du ferment oxydant. Grâce à ce réactif, déjà employé par Schœnbein, M. G. Bertrand put reconnaître la présence de ce ferment dans des végétaux, ou des portions de végétaux en voie de croissance rapide (luzerne, trèfle, tubercules de pomme de terre et de dahlia, racine de navet, de carotte.....). Dans certains de ces végétaux, riches en laccase, il put, par précipitation alcoolique obtenir un précipité doué d'un grand pouvoir oxydant (1).

Non seulement certaines phanérogames, mais aussi divers champignons contiennent un ferment oxydant. Le 20 juillet 1895, MM. Bourquelot et Bertrand présentaient à la Société de Biologie une note (2) dans laquelle ils signalaient le bleuissement de la teinture de résine de gaïac par des espèces appartenant à divers genres, notamment *Russula* Fr. (*R. foetens* Pers., *nigricans* B., *cyanoxantha* Sch.,), *Lactarius* Pers. (*L. vellereus* Fr., *volemus* Fr., *piperatus* Scop.,). Ils constataient aussi l'oxydation du laccol, du pyrogallol, de l'hydroquinone, par l'une de ces espèces, le *R. foetens*. Dans la même séance (3) ils montraient que le changement de couleur de la chair de certaines espèces, lorsqu'on les brise, est causé par l'oxydation d'un chromogène spécial, sous l'influence d'un ferment oxydant. Ils reproduisaient en effet, en ajoutant du suc de russules riches en ferment oxydant au décocté alcoolique, préalablement étendu d'eau, du *Boletus cyanescens* B., la même coloration bleue que prend le champignon, à la cassure. Le même fait se produisait en remplaçant le suc de russule par une solution de laccase de l'arbre à laque. En traitant à l'ébullition par l'alcool d'abord, puis par l'eau, le *Russula nigricans* B., ils obtenaient un décocté aqueux, qui, par addition de suc de russules, se colorait en rouge, puis en noir, couleur par lesquelles passe, après cassure, la chair du même champignon. On pouvait constater en même temps une absorption d'oxygène ; mais,

(1) C. R. ; CXXI, p. 165, 15 juillet 1895 ; et Bull. Soc. Chim. Paris ; XIII, p. 1095, 1895.

(2) C. r. Soc. Biol. ; (10) II, p. 579, 1895.

(3) Ibid., p. 582.

chose singulière, la laccase de l'arbre à laque était sans action sur le chromogène du *Russula nigricans*.

Dans la suite, MM. Bourquelot et Bertrand ont étendu leurs observations, et ont constaté (1) que beaucoup de champignons contiennent un ferment oxydant. C'est ainsi que sur 19 *Russula* essayés, 19 en contenaient, 18 *Lactarius* sur 20, 4 *Psalliota* sur 5, 10 *Boletus* sur 18..... Ce ferment semble d'ailleurs plus résistant à l'action de la chaleur que les autres diastases ; pour le détruire totalement, il faut en effet le maintenir quelque temps à la température de l'ébullition. Ils constatèrent également que le mécanisme de la coloration, à l'air, du *Lactarius flavidus* Boud., du *Boletus luridus* Sch., et du *Boletus erythropus* Pers. était tout à fait analogue à celui des deux espèces déjà étudiées (2). Ils montrèrent que, comme la résine de gaïac, le chromogène du *Boletus cyanescens* B. peut se colorer en bleu non seulement par la laccase, mais par divers oxydants (perchlorure de fer, hypochlorite de soude, bioxyde de plomb) ; mais le chromogène du *Russula nigricans* B., qui peut être extrait, à l'état cristallin, de ses solutions aqueuses, n'est pas influencé dans ces conditions. Ainsi le ferment oxydant, contenu dans ce dernier champignon, différerait de la laccase, à moins qu'il n'y ait présence simultanée de deux ferments, dont l'un modifierait le chromogène de façon à le rendre oxydable par le second, qui serait la laccase.

Cette hypothèse fut reprise par M. Bertrand (3). Il remarqua que la laccase n'oxyde que des corps de la série aromatique, et, parmi eux, seulement les phénols polyatomiques, surtout ceux du genre para, les ortho s'oxydant moins facilement, les méta difficilement. Les oxhydriles phénoliques peuvent d'ailleurs être remplacés par le groupe AzH^2 . Au contraire, les monophénols et les monoamines aromatiques ne sont pas, ou presque pas, influencés par la laccase (4). D'autre part il identifie le chromo-

(1) Communication à la Soc. mycol. Fr., 28 septembre 1895 ; *Bull. Soc. Myc. Fr.*, XII, p. 18, 1896 ; et *Journ. Pharm. et Ch.*, (6), III, p. 97, 1896.

(2) Séances du 5 et du 28 septembre 1895, Soc. mycol. de France. — *Bull. Soc. myc. Fr.*, XII, p. 27, 1896 ; et *Journ. pharm. et chim.*, (6), III, p. 177, 1896.

(3) *C. R.*, CXXII, p. 1215, 26 mai 1896, et *Bull. Soc. chim.*, XV, p. 791, 1896.

(4) *Bull. Soc. chim.*, XV, p. 793, 1896.

gène du *Russula nigricans* avec la tyrosine, et constate dans les sucres de betterave, de dahlia, de pomme de terre, qui contiennent de la tyrosine, le même changement spontané de couleur, attribuable, par suite, au même ferment. Ce ferment du *Russula nigricans*, il le nomme *tyrosinase*. La tyrosinase devient moins active lorsqu'on cherche à la précipiter ; mais, pour l'étudier, on peut prendre comme solution de ferment le suc de la plupart des *Russula* (*R. foetens*, Pers., *virescens* Sch., *cyanoxantha* Sch.,...), ou, à défaut, la macération de ces champignons desséchés dans le vide. Quant à la deuxième hypothèse, formulée avec M. Bourquelot, qu'il pourrait s'agir ici d'une action préalable d'un autre ferment, suivie d'une oxydation par la laccase, M. Bertrand la réfute en mettant en contact au préalable, dans le vide, une macération de *Russula* avec la tyrosine, en chauffant à 100° et ajoutant ensuite, en présence de l'air, de la laccase : il ne se fait aucune oxydation. Les champignons contiendraient donc un autre ferment oxydant que la laccase, la tyrosinase.

Le 18 juillet 1896, M. Bourquelot (1), essayant sur la tyrosine l'action d'une macération, dans l'eau chloroformée, des champignons broyés avec du sable, constate que la tyrosinase se trouve chez tous ceux qui contiennent un ferment oxydant. En effet, aucun n'agit sur la résine de gaïac sans agir sur la tyrosine (2). Par contre, chez les phanérogames riches en ferment oxydant (*Senecio vulgaris*, *Lactuca sativa*, *Taraxacum dens-leonis*.....), indiquées par Schœnbein, il n'y a pas de tyrosinase.

M. Bourquelot recherche ensuite quelle peut être l'influence de la réaction du milieu sur l'activité du ferment oxydant. Pour la première fois (3), il emploie et conseille comme source de

(1) *C. r. Soc. biol.*, (10), III, p. 811.

(2) A la suite de recherches plus étendues (*Bull. Soc. myc. Fr.*, XIII, p. 65, 1897), M. Bourquelot a constaté quelques rares exceptions. Sur 50 espèces actives, 4 seulement agissaient sur le gaïac et non sur la tyrosine, fait qui pourrait être expliqué, autrement que par l'absence de tyrosinase, en admettant la présence d'une substance s'opposant à l'action de ce ferment.

(3) *C. r. Soc. biol.*, (10), III, p. 825, 25 juillet 1896; et *C. R. Acad. sc.*, CXXIII, p. 260, 27 juillet 1896.

ferment oxydant un champignon très riche à ce point de vue, entièrement blanc, et donnant une macération qui ne se colore pas spontanément à l'air, le *Russula delica* Fr. Suivant les substances, l'oxydation réussit mieux en milieu acide, ou en milieu alcalin. Tandis qu'une proportion de 50/1000 d'acide acétique n'empêche pas l'oxydation de la résine de gaïac, cette quantité d'acide empêche l'oxydation de l'eau saturée d'aniline; mais en présence de 10/1000 d'acide, on obtient une oxydation bien plus marquée que sans addition d'acide. Il en est de même avec l'ortho- et la paratoluidine. Au contraire, l'action sur le phénol, en présence d'acide, est nulle; elle est intense si l'on fait agir le ferment sur une solution phéniquée à 5/1000 contenant jusqu'à 4/1000 de carbonate de soude cristallisé. Quant aux acides minéraux, ils empêchent l'action du ferment.

L'action du *Russula delica* sur divers corps phénoliques, ou dérivés des phénols (éthers phénoliques, amines aromatiques) a été ainsi étudiée par M. Bourquelot, en tenant compte des influences du milieu (1). Notons seulement, parmi la longue suite des corps essayés, que l'eau saturée de gaïacol peut remplacer la résine de gaïac dans la recherche des ferments oxydants; il se forme, par oxydation, une couleur rouge orangé, puis un précipité rouge grenat soluble dans l'éther avec couleur jaune. Dans ces expériences, qui ont été faites sur un grand nombre de phénols, ou de dérivés des phénols, toujours il s'est produit, en milieu de réaction favorable, une oxydation, manifestée par la formation des couleurs les plus variées, avec ou sans précipités.

La solution oxydante préparée avec le *Russula delica* est à partir de ce moment tout indiquée, par suite de son grand pouvoir oxydant, pour toute recherche concernant la tyrosinase, ou l'action de celle-ci sur les phénols. Aussi est-ce à cette solution que s'est adressé, par la suite, M. Bertrand, pour démontrer que, dans les champignons, la laccase existe à côté de la tyrosinase (2).

(1) C. R., CXXIII, p. 345, 3 août 1896. — *Journ. pharm. et chim.*, (6), IV, p. 241 et p. 440, 1896; et V, p. 8, 1897.

(2) C. R., CXXIII, p. 463, 14 septembre 1896; et *Bull. Soc. chim.*, XV, p. 1218, 1896.

Il constate d'abord qu'en chauffant quelque temps à 50, 60, 70°, du suc, ou une macération de *Russula foetens*, ou de *R. cyanoxantha*, on arrive à diminuer, puis à détruire complètement son pouvoir oxydant vis-à-vis de la tyrosine, sans que le liquide cesse d'oxyder l'hydroquinone ou la résine de gaïac. M. Bertrand interprète ce fait en admettant que les deux ferments coexistent dans le champignon, et que l'un d'eux, la laccase, résiste plus que l'autre, la tyrosinase, à l'action de la chaleur. C'est alors que, s'adressant au suc de *Russula delica*, il le précipite par l'alcool, le concentre dans le vide à 40-50°, et obtient un liquide oxydant l'hydroquinone, mais pas la tyrosine. La laccase se trouverait ainsi séparée. Quant au précipité alcoolique, dissous à plusieurs reprises et soumis à plusieurs précipitations alcooliques, il donne finalement une solution aqueuse agissant à peine sur l'hydroquinone, mais rapidement sur la tyrosine. La tyrosinase serait ainsi séparée, avec un peu de laccase.

Si, par action de la chaleur, le pouvoir oxydant vis-à-vis de la tyrosine disparaît le premier, il en est de même par longue conservation, soit à la lumière, soit à l'abri de la lumière, comme l'a constaté M. Bourquelot (1). Une macération, au 1/5 dans dans l'eau chloroformée, du *Russula delica* broyé avec du sable, conservée en vase plein, à l'obscurité, pendant un temps variant de 2 mois à 6 semaines, garde son activité sur la tyrosine, le gaïac et le gaïacol; mais au bout d'un certain temps, elle cesse d'agir sur la tyrosine et divers dérivés phénoliques. La rapidité relative de cette diminution d'action serait un obstacle à l'admission de la macération de *Russula delica* au nombre des réactifs usuels, rôle pour lequel la désignent les réactions diverses qu'elle produit avec les phénols, si M. Bourquelot n'avait indiqué que la macération glycinée du même champignon conserve intégralement ses propriétés d'une année à l'autre (2).

Pour préparer le réactif, on emploie pour une partie, en poids, du champignon mondé, deux parties, en volume, de glycérine. Le champignon est broyé avec du sable lavé; on mé-

(1) *C. r. Soc. biol.*, (10), III, p. 893, 1896.

(2) *C. r. Soc. biol.*, (10), IV, p. 454, 1897.

lange la masse avec la glycérine, et, après une heure de contact, on jette sur un filtre mouillé. Le *Russula delica* peut être remplacé, comme l'a indiqué M. Bourquelot (1), par le *Lactarius velutinus* Bert., ou le *L. vellereus* Fr., qui sont cependant un peu moins actifs.

J'ai eu l'occasion d'essayer au laboratoire de M. Bourquelot diverses solutions de ferment oxydant retirées des champignons : des macérations aqueuses, chloroformées, de *R. delica*, conservées près de 3 ans, avaient perdu tout pouvoir oxydant sur la résine de gaïac, le gaïacol et la tyrosine. Le même fait s'était produit en 11 mois avec le *Lactarius piperatus* Scop. Exceptionnellement, une macération chloroformée de *L. velutinus* préparée le 1^{er} novembre 1896 agissait encore le 28 juin 1899 sur ces trois réactifs. Une macération chloroformée de *Russula foetens* Pers., préparée le 1^{er} juillet 1898, n'agissait plus. le 28 juin 1899, que sur les deux premiers réactifs. Cette inégalité de durée de conservation du ferment n'a rien qui surprenne, si l'on admet que, suivant les conditions de végétation, la proportion de ferment oxydant, et son activité, peuvent varier dans un même champignon ; cette supposition peut s'appuyer sur le fait suivant : les champignons qui, en temps ordinaire, bleussent fortement par froissement, subissent à peine, pendant les années très sèches, un léger changement de couleur (fait que j'ai pu constater en 1899 pour le *Boletus cyanescens* B.).

Des faits contradictoires sont encore à signaler, qui ne peuvent être expliqués uniquement par la coexistence de deux ferments oxydants : une macération glycérinée de *Russula delica*, préparée le 25 octobre 1898, agit encore le 28 juin 1899 sur le gaïacol et la tyrosine, mais le 8 juin 1900, elle n'agit plus que sur la tyrosine. Il semblerait donc que la tyrosinase ait résisté ici plus que la laccase, fait en contradiction avec ce qui a été signalé précédemment. On se trouve donc forcé d'attribuer ces faits à l'action du milieu, qui, suivant le moment et le lieu où le champignon a été récolté, peut être variable, ainsi que la quantité de ferment oxydant.

A propos d'action de milieu, j'ai pu reconnaître que de pe-

(1) Journ. pharm. et chim., (6), IV, p. 242, 1896.

tites quantités de chloroforme sont d'un mauvais effet sur la conservation des ferments oxydants. Une macération glycérinée de *Russula delica* avait été divisée en deux parties, dont l'une avait été additionnée ensuite de 10 gouttes de chloroforme pour 60 cc. de solution. Au bout de 8 mois, il y avait une différence manifeste entre les pouvoirs oxydants des deux portions. La portion non chloroformée oxydait instantanément, et de façon très intense, le gaïacol ; l'autre portion ne manifestait son action que plus lentement et plus faiblement. L'oxydation de la tyrosine se produisait aussi plus lentement avec le second liquide qu'avec le liquide non chloroformé. Il n'est donc pas étonnant que l'eau chloroformée soit un milieu relativement peu favorable à la conservation du ferment oxydant. Aussi est-il préférable de recourir à la glycérine : une macération glycérinée de *Russula delica* peut se conserver plus de 19 mois sans cesser d'agir sur le gaïacol et la tyrosine. Néanmoins il vaut mieux renouveler chaque année la provision de réactif oxydant.

CHAPITRE III

*De l'action du réactif **Russula delica** sur les produits des digestions pepsiques et pancréatiques.*

Le réactif dont je viens de rappeler l'histoire était tout désigné pour une étude comparée des digestions trypsiques et pepsiques. Et particulièrement, ayant été déjà plusieurs fois employé par M. Bourquelot et ses élèves (1) pour la recherche de la tyrosine, ce réactif convenait parfaitement pour la caractérisation des peptones trypsiques qui renferment la tyrosine.

MM. Bourquelot et Bertrand ont montré que le chromogène du *Russula nigricans* (identifié par M. Bertrand avec la tyrosine) s'oxyde en présence de la tyrosinase, avec formation d'une couleur rouge passant peu à peu au noir, et donnant finalement un précipité noir. Quel est le pigment obtenu, y a-t-il formation successive de deux pigments, peut-on réaliser artificiellement la même oxydation ; autant de questions non résolues encore. Récemment M. Gessard (2) a indiqué que de faibles quantités de tyrosinase étaient incapables de transformer la tyrosine en composé noir ; l'action s'arrête à la formation du

(1) E. Bourquelot et V. Harlay. Sur la recherche et la présence de la tyrosine dans quelques champignons, *Bull. Soc. Myc.*, XII, p. 153, 1896.

J. Bougault. Sur la recherche de la tyrosine dans divers produits d'origine animale, *C. r. Soc. Biol.* (10) IV, p. 455, 1897.

E. Bourquelot et H. Hérissé. Tyrosine, leucine et asparagine dans la gousse verte de grosse fève. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), VIII, p. 385, 1898.

E. Bourquelot et H. Hérissé. Sur la présence d'un ferment soluble, protéohydrolytique dans les champignons. *Ibid.* p. 448.

(2) *C. R. Acad. Sc.*, CXXX, p. 1327, mai 1900.

rouge, que l'auteur pense être identique au composé rouge obtenu par action du réactif de Millon. S'il se forme du noir, c'est que la solution de ferment contient une substance facilitant l'action du ferment, et résistant d'autre part à l'action de la chaleur. Plusieurs sels métalliques peuvent jouer ce rôle ; les sels alcalinoterreux principalement et le phosphate d'ammoniaque amènent le noircissement des solutions restées rouges. L'ébullition en présence de ces sels facilite leur action. Certains corps solides (craie, talc, amidon, soie.....), plongés dans la solution rouge, fixent la matière colorante à l'état noir (1). Il y aurait, pour M. Gessard, simple modification de la matière colorante, et la différence de couleur, avec formation d'un précipité, serait due à une modification des conditions d'adhésion de la matière colorante au liquide.

Cette interprétation s'accorde mal avec une observation inédite de M. J. Bougault (2) sur l'acide hydroparacoumarique. On sait que cet acide, duquel dérive, par substitution de AzH^2 à H, la tyrosine $(^1)\text{OH}-\text{C}^6\text{H}^4-(^1)\text{CH}^2-\text{CH}(\text{AzH}^2)-\text{CO}^2\text{H}$, donne comme elle la réaction de Millon. D'autre part, par action de la tyrosinase, il se forme une coloration rouge tout à fait semblable à celle que donne la tyrosine ; mais quelle que soit la durée de l'action, quelle que soit la quantité du réactif oxydant, la coloration reste toujours rouge. On ne peut attribuer ce fait à la nature acide du corps essayé, car la neutralisation préalable par le carbonate de chaux, ou l'addition préalable de quantités variées de carbonate de soude, pourvu qu'il n'y en ait pas un excès qui empêcherait l'oxydation, n'altèrent en rien la couleur. Il en est de même de l'addition de sulfate de magnésie, ou de phosphate d'ammoniaque, non plus que de l'ébullition en présence de ces sels ou en leur absence. Il semblerait donc que la coloration noire produite avec la tyrosine soit liée à l'existence du groupe AzH^2 dans la chaîne latérale, et cette idée serait confirmée par ce fait, constaté par M. Bourquelot, qu'avec la tyrosinase en solution légèrement acide (acide acétique), la tyrosine, liée

(1) M. Bourquelot a déjà observé un pareil phénomène de teinture par action de la tyrosinase sur le sulfate d'aniline en présence d'un tissu de coton. *Journ. Pharm. et Chim.* (6), V, p. 9, 1897.

(2) Je remercie ici mon ami J. Bougault qui m'a communiqué cette observation.

par sa fonction amine, reste longtemps colorée en rouge, et qu'en solution faiblement alcaline (carbonate de soude), la tyrosine, combinée par sa fonction acide, se colore lentement en noir, sans formation de couleur rouge. Ces faits montrent en tous cas que la coloration rouge, puis noire, par *le Russula delicata*, est une réaction de la tyrosine, plus spécifique que la réaction de Millon, qui se produit non seulement avec l'acide hydroparacoumarique, mais avec tous les albuminoïdes vrais. Quelle est maintenant l'action de la tyrosinase sur les produits de digestion ?

I. — DIGESTIONS PANCRÉATIQUES (1).

Puisque la tyrosine se trouve au nombre des produits de digestion pancréatique, l'action de la tyrosinase sur ces produits est facile à prévoir (2).

J'ai essayé à ce point de vue les produits de digestion pancréatique des corps suivants : fibrine, albumine, caséine, cong lutine (caséine végétale des amandes), gluten; chair musculaire, gélatine.

FIBRINE. — Un essai de digestion est fait avec :

Fibrine essorée	30 gr.
Pancréatine	0 gr. 60
Eau distillée chloroformée.....	150 gr.

Après 6 heures de digestion à 45-50°, le liquide, ne troublant plus par l'acide azotique, est filtré, mis à refroidir et additionné

(1) Au cours de cet exposé, j'emploierai indifféremment les termes tryptique et pancréatique, mes essais faits avec la pancréatine, n'ayant trait qu'à l'action du ferment protéolytique, la trypsine, qui y est contenue.

(2) M. Denigés a proposé dernièrement un nouveau réactif de la tyrosine (*C. R. Acad. Sc.*, CXXX, p. 583, 1900). C'est un mélange de 2^{cc} d'acide sulfurique avec 3 à 5 gouttes d'une solution alcoolique au 1/3 d'aldéhyde. Il se forme une coloration groseille par addition de tyrosine cristallisée ou en solution. Les albuminoïdes et les peptones sont sans action sur le réactif, fait qui pourrait permettre de l'utiliser pour l'étude des peptones médicinales; mais des essais m'ont montré que la même réaction se produit à peu près aussi intense avec les liquides des digestions pepsiques ou pancréatiques. L'intensité de la coloration produite, l'extrême sensibilité du réactif, et la présence, d'autre part, de petites quantités de tyrosine dans les pepsines commerciales (J. Bougault, *l. c.*) s'opposent donc à l'emploi de cette réaction dans l'étude présente.

de quelques gouttes de réactif oxydant. Au bout de quelques minutes se développe la coloration rouge caractéristique, se transformant, en quelques heures, en une couleur brun-noir intense avec précipité. Dans le liquide de digestion évaporé, on peut voir au microscope de la leucine et de la tyrosine. De plus, le liquide dépose à la longue de la tyrosine. Un essai, conduit de même avec la fibrine bouillie au préalable, donne les mêmes résultats ; à noter seulement une rapidité moins grande de la digestion.

ALBUMINE. — Le blanc d'œuf cuit, pulvé à travers un tamis de crin selon les prescriptions de la pharmacopée anglaise pour l'essai de la pepsine (voir Chapitre I), était mis en digestion, dans les mêmes proportions que pour la fibrine. Après 6 heures de digestion, et même après 10 heures, le liquide se trouble encore par l'acide azotique, l'albumine étant de digestion trypsique plus difficile que la fibrine. Le liquide filtré se colore en rouge, puis en noir par addition de suc glycériné de *Russula delica*. Une petite partie, concentrée au bain-marie, laisse voir au microscope de la leucine et de la tyrosine. Dans cet essai, il était préférable de neutraliser par l'acide acétique la liqueur légèrement alcaline (alcalinité de l'albumine), avant d'ajouter la tyrosinase, les alcalis retardant l'oxydation.

Dans d'autres essais, j'ai employé l'albumine coagulée dans ses solutions, en milieu acétique, la coagulation se faisant mal quand on n'a pas la précaution d'ajouter de l'acide pour neutraliser l'alcalinité de l'albumine.

Un blanc d'œuf (25 gr. environ) était battu dans 500^{cc} d'eau, et le liquide était chauffé au bain-marie au-delà de 80°. On ajoutait alors peu à peu de l'acide acétique à 1/100, qui déterminait immédiatement la formation du coagulum. Celui-ci se redissout au début, puis persiste et devient maximum pour environ 12^{cc},5 d'acide ajouté. Un excès notable d'acide redissoudrait le coagulum. Cette albumine, recueillie sur un filtre, lavée à l'eau jusqu'à neutralité des liquides de lavage, s'essore facilement, et non desséchée, se divise facilement dans l'eau en donnant une suspension présentant l'aspect du lait. L'albumine avait d'ailleurs été mise en essai en quantité telle qu'elle

contint la même quantité de matière sèche que 30 gr. de fibrine essorée. Là encore on put à la fois constater au microscope, dans le liquide concentré, la présence de leucine et de tyrosine, et obtenir par la tyrosinase la réaction tyrosinique rouge puis noire. A la longue, le liquide dépose de la tyrosine.

Un essai de digestion d'albumine crue, calqué sur l'essai type de la digestion de fibrine, avec une quantité d'albumine correspondant à la quantité de matière sèche de la fibrine (1) m'a donné un résultat identique à l'essai celui de précédent.

L'albumine crue est seulement plus difficile à digérer que l'albumine cuite, même en présence de bicarbonate de soude (2 gr. p. 1000, quantité indiquée par la pharmacopée anglaise pour l'essai de la liqueur pancréatique par le lait). 14 heures de digestion à 45-50° n'ont pas suffi pour arriver au terme de non-précipitation azotique.

CASÉINE. — Un essai sur la caséine du commerce réussit de même. La digestion pancréatique est assez facile surtout en présence d'une petite quantité de carbonate de soude. Le liquide obtenu devient rouge, puis noir par la tyrosinase ; il laisse cristalliser, par concentration, de la leucine et de la tyrosine. Les liquides non concentrés déposent à la longue de la tyrosine. Cet essai fut contrôlé par un autre entrepris sur la caséine que j'avais retirée du lait de vache, par le procédé suivi par Adam pour l'analyse du lait. La caséine précipitée avait été lavée à l'eau, puis à l'alcool et à l'éther, et desséchée dans le vide. Les résultats furent identiques.

CONGLUTINE. — La conglutine (caséine des amandes) (2), qui m'a servi pour cet essai avait été préparée par le procédé suivant, indiqué par MM. Bourquelot et Hérissé (3).

« On monde les amandes, on les pulvérise et on les fait macérer pendant 12 heures dans 5 fois leur poids d'eau chloroformée. On exprime, on laisse déposer, on filtre, et, dans le liquide filtré,

(1) La fibrine essorée contient environ 32 0/0 de substance sèche ; le blanc d'œuf en contient en moyenne 13,5 0/0.

(2) Cette conglutine m'a été obligeamment donnée par mon ami H. Hérissé, à qui j'adresse ici mes remerciements.

(3) *Bull. Soc. Myc. Fr.*, XV, p. 66, 1899.

étendu de son volume d'eau chloroformée, on précipite la caséine par addition d'acide acétique (4^{cc} d'acide à 4 0/0 pour 200^{cc} de liquide). On lave d'abord le précipité par décantation avec de l'eau chloroformée, puis on le jette sur un filtre sans pli. On lave successivement avec de l'eau, de l'alcool à 95°, et finalement de l'alcool absolu. On enlève le précipité, on le délaie dans de l'éther, on sépare l'éther par filtration et on dessèche dans le vide. On obtient un produit spongieux blanc ». Ce produit, soumis à la digestion pancréatique, en présence de bicarbonate de soude, a donné un liquide de digestion, qui, après neutralisation par l'acide acétique, s'est coloré par la tyrosinase en rouge, puis en noir. De la leucine et de la tyrosine pouvaient d'ailleurs être obtenues cristallisées dans les produits de digestion, ainsi que l'avaient constaté MM. Bourquelot et Hérissé (l. c.)

GLUTEN. — Le gluten de la farine de blé, retiré en malaxant sous un filet d'eau la farine réduite en pâte dans un nouet, fut soumis à la digestion pancréatique (5 grammes de gluten humide pour 50^{cc} de solution chloroformée de pancréatine à 1/250), à la température de 40°. De temps en temps, on malaxait le gluten dans le liquide, avec un agitateur, pour renouveler les surfaces et détacher la couche des dyspeptones formées. Après 18 heures de digestion, le liquide donnait avec la tyrosinase la réaction tyrosinique, et, par concentration, laissait cristalliser, à côté de beaucoup de leucine, un peu de tyrosine.

CHAIR MUSCULAIRE. — La chair musculaire de bœuf, divisée, et soumise à la digestion pancréatique à 40° pendant 6 heures, donne un liquide, où l'on peut déceler la tyrosine, à la fois au microscope, après concentration, et par la réaction colorée que produit la tyrosinase (rouge puis brun-noir).

GÉLATINE. — Une solution de gélatine à 13 gr. pour 200^{cc} d'eau, faite à chaud, est refroidie à 45°, puis additionnée de 40 gr. d'une solution chloroformée de pancréatine à 1/50. Après digestion de 6 heures à 50°, le liquide ne se gélifie pas par refroidissement ; il s'est fait un petit résidu de dyspeptone. Le liquide, concentré, laisse cristalliser de la leucine, et pas de tyrosine, et la tyrosinase n'y donne qu'une très légère colora-

tion rouge-brunâtre, pouvant être attribuée à de faibles quantités de tyrosine existant dans le ferment, comme l'a déjà indiqué M. Bougault (1). En effet une solution de ferment dans les mêmes proportions donne sensiblement la même couleur par la tyrosinase. Le même résultat est obtenu avec le produit de digestion d'une solution de gélatine plus concentrée (1/10); dans ce cas, le liquide cesse de faire prise, déjà après une demi-heure de chauffage à 45-50°.

Dans tous ces essais, chaque fois que la réaction tyrosinique (coloration rouge puis noire) s'est produite nettement, c'est-à-dire dans tous les cas, sauf pour la gélatine, la tyrosine a pu être isolée en nature, ou caractérisée au microscope. Il ne semble donc pas que la coloration puisse être attribuée à l'action de la tyrosinase sur l'un quelconque des produits intermédiaires de digestion; cette réaction tyrosinique est bien spécifique de la tyrosine, et ces observations viennent confirmer celles de MM. Bourquelot et Hérissé (2).

II. — DIGESTIONS PEPSIQUES.

Avec les produits des digestions pepsiques, la réaction que donne la tyrosinase est différente, l'action pepsique étant moins profonde que l'action trypsique.

FIBRINE. — On fait de la façon suivante un essai, calqué sur le mode préparation de la peptone médicinale (Suppl. Codex, 1895).

Fibrine essorée.....	30 gr.
Pepsine médicinale.....	1 gr. 50.
Acide chlorhydrique officinale.....	1 gr. 50.
Eau distillée chloroformée.....	150 gr.

Après digestion au bain-marie à 45-50°, jusqu'à ce que le liquide cesse de précipiter par l'acide azotique, on filtre et on neutralise aussi exactement que possible par le bicarbonate de soude, puis on additionne d'un peu d'acétate de soude, pour éliminer sûrement, en cas de neutralisation imparfaite, toute trace d'acide minéral qui contrarierait ou empêcherait l'action

(1) *C. r. Soc. biol.*, (10), IV p. 455, 1897.

(2) *Bull. Soc. myc.*, XV, p. 65, 1899.

de la tyrosinase. L'addition de quelques gouttes de suc de *Russula* à 10^{cc} du liquide ne produit pas la réaction tyrosinique, mais donne une teinte rouge faisant place, au bout d'un certain temps (plusieurs heures), à une coloration verte intense et durable, analogue à celle de la biliverdine. Pour pouvoir plus sûrement comparer l'action de la tyrosinase sur les produits des digestions pepsiques et pancréatiques, j'ai fait simultanément plusieurs digestions portant sur 30 gr. de fibrine. Les liquides pancréatiques ont été additionnés, à la fin de l'opération, de 1 gr. 50 d'acide chlorhydrique officinal, quantité contenue dans les liquides pepsiques ; puis les liquides pepsiques et pancréatiques ont été neutralisés en même temps, soit par le bicarbonate de soude, soit par le carbonate de chaux. Dans tous les cas, les digestions pancréatiques ont donné avec la tyrosinase la couleur rouge passant au noir ; les digestions pepsiques ont donné la couleur rouge passant ensuite au vert. La réaction verte n'est donc pas une modification de la réaction tyrosinique, modification qui serait due à la présence de sels. Et d'ailleurs, l'évaporation du liquide pepsique ne donne pas de tyrosine. La même couleur verte s'est produite avec les liquides provenant de la digestion de la fibrine par des pepsines différentes. Elle est donc caractéristique de toute digestion pepsique de la fibrine. La fibrine cuite donne les mêmes résultats, quoique plus difficile à digérer.

ALBUMINE. — Les essais ont été faits par digestion du blanc d'œuf coagulé, pulvé à travers un tamis de crin, ou coagulé en solution en présence d'acide acétique. La digestion est facile. En particulier, cette dernière méthode donne un produit qui se prête très bien à l'étude des digestions pepsiques et pourrait être utilisé pour l'essai de la pepsine. La tyrosinase donne avec les produits neutralisés par le bicarbonate de soude, ou le carbonate de chaux, une coloration rouge puis verte intense, tout-à-fait semblable à celle obtenue avec les digestions de fibrine. Au microscope, pas de tyrosine dans le liquide concentré.

Il en fut de même avec l'albumine crue. Dans un essai calqué sur l'essai type de digestion de la fibrine, en admettant pour l'albumine une teneur de 13,50 de matière sèche, et 32 % pour

la fibrine essorée, l'albumine s'est montrée très difficile à digérer. 14 heures de digestion n'ont pas abouti au terme de non-précipitation azotique. Par contre, la tyrosinase a coloré le liquide, préalablement neutralisé, en rouge, puis en vert (un peu moins pur cependant que dans les cas précédents).

CASÉINE. — 2 essais ont été faits sur la caséine du commerce et sur celle que j'avais retirée du lait de vache. On employait :

Eau distillée chloroformée.....	45 gr.
Pepsine.....	0 gr. 20.
Caséine.....	5 gr.
Acide chlorhydrique officinal au 1/10.....	5 ^{cc} .

Dans aucun des deux cas, après digestion à 40°, pendant 42 et 66 heures, la caséine ne fut digérée complètement. Le liquide était épais, trouble, impossible ou très difficile à filtrer. Mais par neutralisation, par le carbonate de chaux et filtration, on obtenait un liquide clair qui, additionné de tyrosinase, prenait une couleur rouge, puis d'un vert intense, avec teinte verte tirant plus sur le bleu que dans les essais précédents. Le liquide coloré en vert était doué d'une fluorescence rouge très nette. (Nous aurons l'occasion d'y revenir dans le chapitre suivant.) Pas de tyrosine par évaporation du liquide.

CONGLUTINE. — On fait digérer, à 40°, 1 gr. de cong lutine dans le mélange indiqué au paragraphe précédent. Après 24 heures de digestion, la cong lutine est totalement digérée, sauf un résidu de 0 gr. 147. La digestion s'est montrée plus facile que par la pancréatine. Le liquide, neutralisé, puis additionné de tyrosinase, s'est coloré en rouge puis en vert.

GLUTEN. — Le gluten de blé s'est digéré plus facilement par la pepsine que par la trypsine. Le liquide neutralisé a donné avec la tyrosinase une couleur rouge puis d'un vert intermédiaire entre le vert que donne la fibrine et celui que donne la caséine.

CHAIR MUSCULAIRE. — La préparation de la peptone médicinale, selon le Supplément du Codex (1895), donne un produit qui, neutralisé, se colore en rouge, puis en vert olive par la tyrosinase. La même couleur peut être obtenue avec diverses peptones du commerce, après neutralisation de leurs solutions

par le carbonate de chaux, en particulier avec les deux peptones dont j'ai précédemment indiqué les pouvoirs rotatoires en solution à 2 % (-50° et -50°,83) (1).

GÉLATINE. — Une solution de gélatine faite à chaud, à 13 gr. (quantité correspondant à la matière sèche de 40 gr. de fibrine) pour 200 gr. d'eau, est refroidie à 45° et additionnée d'une solution de 2 gr. de pepsine dans 27^{cc} d'eau contenant 2 gr. d'acide chlorhydrique officinal. On obtient ainsi un mélange tout-à-fait comparable à l'essai type de digestion de la fibrine. Après 6 h. de digestion à 45-50°, le liquide refroidi ne se gélifie pas ; séparé, par filtration, du précipité de dyspeptone formé, et traité, après neutralisation, par la tyrosinase, il donne une légère couleur rouge brunâtre attribuable seulement à des traces de tyrosine contenues dans la pepsine (2). La couleur était la même avec une simple solution de pepsine, au même titre.

Il y avait bien eu digestion par la pepsine, car le même mélange, sans pepsine, avec l'acide chlorhydrique seul, se prenait en masse par refroidissement.

Si l'on compare les diverses couleurs obtenues par la tyrosinase, on voit que pour tous les albuminoïdes vrais, produisant de la tyrosine par digestion trypsique, il s'est formé par digestion pepsique un chromogène devenant rouge puis vert par la tyrosinase. La teinte la plus pure est donnée par la caséine (vert-bleuâtre), puis vient le gluten, puis la fibrine, et l'albumine coagulée (vert fiel ou vert chlorophylle) et ensuite l'albumine crue, la conglutine et les peptones de viande (couleur olive).

Toutes ces colorations vertes sont dues probablement à un seul pigment plus ou moins souillé d'impuretés, et que je nomme, sans préjuger de rien, *vert pepsique*. Ce pigment présente la propriété de virer au rouge en réaction alcaline,

(1) M. Bougault (*l. c.*) opérant sur diverses peptones, n'a pas constaté la coloration verte. Sans doute ce fait doit être attribué à la réaction des solutions, la coloration verte ne se développant que très lentement dans les solutions qui n'ont pas été parfaitement neutralisées.

(2) Cf. J. Bougault (*l. c.*).

(ammoniaque, potasse, soude, chaux et de repasser au vert par les acides. En particulier l'ammoniaque convient pour observer ce fait : si au liquide vert olive obtenu avec une peptone du commerce, on ajoute quelques gouttes d'acide chlorhydrique, la teinte devient un peu plus pure : mais surtout elle fait contraste avec la teinte rouge qu'on obtient à la partie supérieure du liquide par addition de quelques gouttes d'ammoniaque. La coloration noire ou brunâtre obtenue avec les peptones pancréatiques ne varie pas par l'addition d'alcali ou d'acide.

Quant à la matière colorante verte, elle ne se laisse pas enlever par agitation avec le chloroforme, l'éther acétique, l'alcool amylique. Si on évapore le liquide vert au bain-marie, à sec, et qu'on reprenne le résidu par l'alcool absolu, à chaud, il n'y a pas de coloration du liquide. Par contre, l'acide acétique dissout le résidu avec la même coloration verte. Les acides minéraux très concentrés, à froid, détruisent la couleur verte : par l'acide sulfurique en forte proportion, elle passe au rouge : elle devient rouge, puis jaune par l'acide azotique. Cette réaction jointe à l'absence de précipité par l'eau de chaux et à l'insolubilité de la matière dans l'alcool, suffit à différencier la matière verte en question, de la biliverdine. Le liquide vert est presque entièrement décoloré par le sous-acétate de plomb, avec précipité vert sale, et la différence avec le pigment dérivé de la tyrosine par oxydation est encore nette ici, celui-ci étant précipité en brun-violacé. J'aurai l'occasion de revenir, au chapitre suivant, sur quelques-unes des propriétés du vert pepsique.

Le chromogène donnant naissance à ce pigment est soluble dans l'alcool fort, de titre supérieur à 93°. En effet, des peptones pepsiques de fibrine ont été épuisées à chaud, successivement par l'alcool absolu, puis par l'alcool à 95°, 93°, 90°, 85° et 75°. Les liquides alcooliques ont été évaporés séparément et leurs résidus repris par l'eau distillée. L'addition de tyrosinase de *Russula* dans ces solutions aqueuses a donné les résultats suivants : couleur rouge virant plus ou moins au noir avec le résidu d'évaporation de l'alcool absolu et de l'alcool à 95° ; couleur brun olive avec le résidu d'évaporation de l'alcool à 93°, couleur rouge puis verte dans les autres cas. Le résidu des traitements alcooliques de la peptone, repris par l'eau, donnait

encore la réaction verte. Mais la coloration la plus nette était donnée par les résidus d'évaporation des alcools à 85° et 75°. La couleur rouge-noire dans les deux premières portions, est due aux traces de tyrosine existant dans la pepsine.

Une digestion pepsique prolongée ne détruit pas le chromogène, ainsi que j'ai pu le constater en abandonnant 15 jours à la température du laboratoire une digestion pepsique de fibrine, menée à 40° jusqu'au terme de non précipitation azotique. De même une digestion pepsique de fibrine sèche, pulvérisée, poursuivie près de 6 mois à 40°, a donné encore au bout de ce temps une réaction assez nette (olive). Mais les acides à l'ébullition le détruisent. L'ébullition de 100 gr. de liquide de digestion pepsique de la fibrine, en présence de 2 gr. d'acide sulfurique, au réfrigérant à reflux pendant 1/2 heure, donne un liquide, qui neutralisé, donne par la tyrosinase une couleur rouge, puis brune. Il y aurait donc destruction du chromogène, peut-être avec formation ultérieure de tyrosine.

Il en est de même encore si l'on soumet le produit de la digestion pepsique de la fibrine à l'action de la trypsine. En ajoutant 0 gr. 80 de pancréatine au produit de digestion pepsique de 40 gr. de fibrine, filtré et neutralisé, et en faisant digérer 6 heures à 45-50°, on obtient un liquide qui devient, par la tyrosinase, rouge puis noir intense. Le liquide contient de la tyrosine, faiblement décelable au microscope. Quant au chromogène pepsique, il est probable qu'il a disparu ; toutefois la réaction colorée ne suffirait pas, à elle seule, à le prouver, la coloration noire pouvant masquer la coloration verte, au cas où elle se produirait ; on verra, au chapitre suivant, que la matière verte est réellement absente, et, par suite, que le chromogène est détruit par digestion trypsique.

CHAPITRE IV

*De l'action du réactif **Russula** sur les produits des digestions déterminées par la papaïne.*

Application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques végétaux.

Les ferments protéolytiques animaux, pepsine et trypsine, ne sont pas les deux seuls ferments protéolytiques connus ; le règne végétal en fournit d'autres qu'on a nommés soit pepsines végétales, en considérant qu'ils peuvent agir en milieu acide, soit trypsines végétales, en considérant que parmi les produits des digestions qu'ils déterminent se rencontrent des acides amidés, leucine, tyrosine. Mais les recherches anciennes, faites sans aucune précaution antiseptique, ont pu faire attribuer à des ferments végétaux des actions digestives qui étaient dues en réalité à l'intervention de microorganismes, et chez certaines plantes dites carnivores, l'existence de ferments protéolytiques est encore douteuse.

Dans le liquide des urnes des *Nepenthes*, par exemple, un ferment des albuminoïdes a été successivement signalé et étudié par Hooker, Lawson Tait, Gorup-Besanez, Vines. Depuis, M. Raphaël Dubois n'a obtenu avec ce liquide aucune digestion des albuminoïdes (1). Vines, reprenant la question (2), constate en présence d'acide cyanhydrique ajouté comme antisept-

(1) *C. R.*, 1890.

(2) The digestive ferment of *Nepenthes*; *Ann. of Botany*, X, 1896.

The proteolytic enzyme of *Nepenthes*; *Ibid.*, XI et XII, 1897-1898.

tique, en milieu acide ou alcalin, la formation de peptones à partir de la fibrine crue. Récemment, M. Couvreur (1) a expliqué le fait de la digestion en présence d'acide par l'action unique de l'acide et celui de la digestion en présence de carbonate de soude, par une digestion saline de la fibrine. Le liquide des *Nepenthes* n'aurait par suite aucune action digestive, et la soit-disant digestion des insectes capturés par ces plantes serait une putréfaction.

Il semble en être de même pour les *Drosera*, dont les poils des feuilles sécrètent, quand on les excite, un liquide acide. D'après Darwin, la sécrétion n'est digestive que quand la substance excitant la feuille est digestible. D'autre part, Hoppe-Seyler (2) a recherché en vain le ferment digestif du *Drosera rotundifolia* L. Dans quelques essais que j'ai fait moi-même sur cette plante, je ne suis pas arrivé non plus à un résultat positif. Deux récoltes de *Drosera rotundifolia* m'ont fourni, en séparant les limbes des feuilles au moyen de ciseaux fins, l'une 3 gr., l'autre 6 gr. de feuilles adultes, fraîches, saines. Ces feuilles, mises à macérer avec 3 à 6 fois leur poids d'eau chloroformée, donnaient après expression un liquide légèrement acide, rouge, virant au vert par les alcalis. Ce liquide s'est montré sans action digestive sur la fibrine fraîche séchée à 40°, puis gonflée, avant l'emploi, dans l'eau chloroformée. Soit qu'on l'employât tel quel, soit qu'on l'acidifiât par 1,5/1000 d'acide chlorhydrique (HCl), soit qu'on l'additionnât de 2/1000 de bicarbonate de soude, le liquide n'a eu non plus aucune action digestive apparente sur la fibrine fraîche, en filaments très fins. Dans tous les cas, les essais présentaient le même aspect que des essais témoins faits avec le même liquide, bouilli au préalable.

Il existe cependant des ferments protéolytiques végétaux dont le pouvoir digestif est incontestable. De ce nombre est le ferment des *Carica*, la papaine. Je n'ai pas l'intention de faire l'histoire de ce ferment, qui, déjà en partie connu par les recherches de Roy (1875), Wittmack (1878), Peckolt (1879), Moncorvo (1879), a été étudié successivement par Würtz et Bou-

(1) *C. R.*, CXXX, p. 848, 1900.

(2) *Plüger's Archiv*, XIV, p. 395.

chut (1879-1880), Martin (1884-1885), Helbing et Passmore (1893), Davis (1893), Sharp Gordon (1893-1894), Rideal (1894-1895)... Mais je veux immédiatement exposer ici ce qui a trait à l'action de la tyrosinase sur les produits des digestions pepsiques, et montrer, par l'emploi du réactif *Russula*, qu'il y a une certaine analogie entre ces produits et ceux qui se forment par action pepsique.

Pour faire ces recherches, il fallait, avant tout, se servir de papaine vraie et active, et non de papaines inactives, comme il s'en trouve dans le commerce, ou mélangées, soit de pepsine, soit de pancréatine. C'est dans ce but que je m'adressai au latex même du *Carica* (1). Mes premiers essais de digestion furent faits avec la fibrine fraîche. J'ai fait ensuite avec une papaine du commerce, reconnue authentique, d'autres essais sur les albuminoïdes déjà mis en œuvre dans le chapitre précédent.

FIBRINE. — Si l'on sectionne les branches et les pétioles du *Carica*, le latex suinte abondamment sur la section, sous forme d'un liquide séreux, qui se coagule presque instantanément à l'air. En pratiquant des sections successives, et en râclant le latex coagulé, de consistance gélatineuse, j'ai obtenu, par ce procédé assez long de 5 gr. environ de suc, *Carica*. Ce suc coagulé fut additionné de quelques gouttes de chloroforme, ce qui détermina sa fluidification, puis dilué au 1/3 par addition d'eau distillée, et filtré. Le liquide presque limpide, un peu opalescent, s'était légèrement coloré en rose à l'air. Ce liquide fut dilué à nouveau au 1/10 et divisé en trois portions, dont l'une fut soumise à l'ébullition. Ces trois portions servirent à l'expérience suivante. Trois flacons contenaient respectivement :

A. Latex dilué à 1/30.....	50 c. c.
Fibrine fraîche essorée	5 gr.
Chloroforme.....	XX gouttes
B. Latex dilué.....	50 c. c.
Fibrine	5 gr.
Bicarbonate de soude.....	0 gr. 10.
Chloroforme	XX gouttes

(1) L'espèce qui me fournit le latex en question n'est pas le *Carica papaya* L., mais une espèce voisine, le *Carica quercifolia* A. St. Hil., dont un magnifique exemplaire ♂ existe dans les serres de l'école de pharmacie de Paris, et dont je pus avoir quelques branches, grâce à l'obligeance de M. le professeur Guignard.

C. Latex dilué bouilli	50 c. c.
Fibrine	5 gr.
Chloroforme	XX gouttes

Les mélanges A et C présentaient une réaction à peine faiblement acide, B avait une réaction alcaline. Les trois mélanges furent chauffés au bain-marie à 45-50° pendant 7 heures. En 20 minutes, l'action du ferment s'est manifestée en A et B par une désagrégation complète de la fibrine. Par contre, même au bout de 7 heures, la fibrine du flacon C n'avait pas changé d'aspect.

Les liquides ont été filtrés et essayés par l'acide azotique. Dans les deux premiers liquides, il s'est formé un précipité abondant, tandis que le troisième se troublait très faiblement. L'examen polarimétrique donna d'ailleurs les résultats suivants :

$$A. \alpha = -2^{\circ}2'$$

$$B. \alpha = -2^{\circ}24'$$

$$C. \alpha = -32'$$

Si l'on tient compte de ce fait que, sous l'influence de la digestion, le pouvoir rotatoire des substances albuminoïdes subit un décroissement progressif, on voit que la digestion, en milieu à peine acide, a été poussée plus loin que dans le milieu alcalin. D'autre part, la très faible rotation (1) produite en C, et la non attaque de la fibrine prouvent que l'action a été nulle.

Les trois liquides ont été additionnés de tyrosinase ; les liquides A et C, qui étaient à peine faiblement acides, ne furent pas neutralisés au préalable ; B fut neutralisé par addition ménagée d'acide chlorhydrique dilué. Dans ces conditions, très rapidement les trois liquides prirent, par addition de suc glyciné de *Russula*, une teinte rosée, puis rouge assez intense ; et au bout de quelques heures, la couleur devint, pour les liquides A et B, d'un vert absolument pur, tout à fait analogue au vert obtenu de même dans les digestions pepsiques de caséine. Le liquide vert filtré présentait une fluorescence rouge très nette.

(1) La rotation observée est due, partie au latex même, partie à l'action de l'eau sur la fibrine à 45° : 40 grammes de fibrine, maintenus 8 heures à 45° dans 100 grammes d'eau chloroformée donnent un liquide déviant de -10' à -12' le plan de la lumière polarisée, et contenant pour 100 c.c. 0 gr. 20 de substance en solution.

Avec le liquide C, la teinte non très foncée passa finalement au brunâtre. D'autre part, l'action de la tyrosinase sur une petite quantité de latex dilué donna la même couleur qu'en C, rouge, puis brunâtre.

Une deuxième série d'essais fut faite, avec du latex de *Carica*, dans des conditions un peu différentes. Les résultats furent les suivants : en solution acidifiée par 1 0/0 d'acide chlorhydrique officinal (soit 0,34 0/0 de HCl pur), acidité employée pour les digestions pepsiques, l'action fut nulle. En solution ne contenant que, 0,5 0/0 d'acide officinal (0,17 0/0 de HCl pur), l'action, quoique nette, fut bien plus faible qu'en solution non acidulée. Mais dans les deux cas, après neutralisation, la réaction de la tyrosinase fut la même que ci-dessus (couleur rouge, puis verte).

Ayant reconnu, en employant le latex du *Carica*, que la papaïne vraie déterminait la formation, parmi les produits de digestion de la fibrine, d'un chromogène devenant, par action de la tyrosinase, rouge puis vert, je me suis adressé à la papaïne elle-même, extraite du suc de *Carica*.

Des essais furent faits avec deux papaïnes du commerce, toutes deux d'origine allemande. L'une n'avait aucun pouvoir digestif, l'autre dissolvait rapidement la fibrine, et les produits de digestion étaient influencés par la tyrosinase comme ceux obtenus avec le latex même de *Carica*. Trois digestions furent instituées avec cette papaïne :

a en solution contenant 0,2 p. 100 d'ac. chlorhydr. officinal (0,068 de HCl pur

b — 0,2 p. 100 de bicarbonate de soude.

c en simple solution aqueuse.

Les solutions contenaient 0 gr. 10 de papaïne par 50^{cc} et agissaient sur 5 grammes de fibrine. Elles furent chauffées au bain-marie de 40 à 45°. La désagrégation fut presque aussi rapide en *b* et en *c*, et à peu près totale en 2 h. 1/2. En *a*, il y eut d'abord gonflement, puis dissolution. Mais, même au bout de 6 heures, quand la digestion fut arrêtée, il restait encore un résidu assez abondant de fibrine gonflée, mais non dissoute. Le liquide *a* filtrait difficilement, et il fut impossible de l'examiner au polarimètre. Par contre *b* et *c* filtraient facilement. Les déviations constatées au polarimètre furent, pour *b*, de — 1°42, pour *c* de — 1°16, ce qui prouve qu'en *b* l'action était

moins avancée qu'en *c*. D'ailleurs, le précipité produit par l'acide azotique était plus abondant en *b* qu'en *c*. Les trois liquides ont donné, par addition de tyrosinase, les deux premiers après neutralisation et le troisième même directement, la coloration caractéristique rouge puis verte. D'autre part, la papaïne elle-même, en solution à 0,40 0/0, après séjour à l'étuve à 40°, n'a donné par la tyrosinase qu'une très faible coloration d'abord rougeâtre, puis jaune brunâtre. La papaïne en question pouvait donc, d'après la réaction déterminée par la tyrosinase dans ses produits de digestion, être considérée comme une papaïne vraie. C'est cette papaïne que j'ai employée dans tous les essais qui suivent. Des essais, entrepris avec cette papaïne et de la fibrine cuite, m'ont donné, au point de vue des couleurs produites par la tyrosinase, les mêmes résultats.

ALBUMINE. — L'essai fut fait, avec le blanc d'œuf coagulé pulvé à travers un tamis de crin, selon les proportions suivantes :

Papaïne.....	0 gr. 40
Eau distillée.....	100 gr.
Blanc d'œuf.....	25 gr.
Chloroforme.....	XXX gouttes.

Un autre mélange était préparé de même, mais avec addition de 0 gr. 20 de bicarbonate de soude. Les deux mélanges furent portés 24 heures à la température de 40°. L'action digestive la plus intense se manifesta dans le premier ; mais tous les deux, après neutralisation aussi exacte que possible par l'acide acétique dilué, et après addition de tyrosinase, devinrent rouges puis verts ; la couleur était cependant un peu moins pure que dans le cas de la fibrine.

CASÉINE. — Un essai fut fait avec la caséine de commerce, aux doses suivantes :

Papaïne.....	0 gr. 20
Caséine.....	5 gr.
Eau distillée.....	50 gr.
Chloroforme.....	XXX gouttes.

Après 2 jours et demi de digestion à 40°, il restait 1 gr. 124 de résidu non digéré, et le liquide de digestion, filtré, devenait, par addition de tyrosinase, rouge, puis d'un vert très pur, offrant une grande analogie avec le vert qu'on obtenait en pareil

cas avec les digestions pepsiques de caséine ; il présentait une fluorescence rouge remarquable. Dans un autre essai, portant sur 4 gr. de caséine que j'avais retiré du lait de vache, il restait, après 42 heures de digestion à 40°, 0 gr. 541 de résidu non digéré. La réaction de la tyrosinase sur les produits de digestion fut la même.

CONGLUTINE. — Pour cet abuminoïde, j'ai opéré dans des milieux de réactions différentes. Le mélange suivant était préparé :

Conglutine.....	1 gr.
Papaine.....	0 gr. 20.
Eau distillée.....	50 gr.
Chloroforme.....	XX gouttes.

Un autre essai était rendu alcalin par addition de 0 gr. 10 de bicarbonate de soude. Dans un 3^e, on avait remplacé 0 gr. 50 d'eau distillée par 0^{cc},5 d'acide chlorhydrique officinal dilué à 1/10, ce qui représentait une acidité de 0,34/1000 en HCl. Après 24 heures de digestion à 40°, il restait comme résidus non digérés : liquide neutre, 0 gr. 139 ; liquide alcalin, 0 gr. 127 ; liquide acide, 0 gr. 146. La digestion avait été favorisée par la proportion de 1/1000 de bicarbonate de soude. La tyrosinase produisait dans les trois liquides (les deux derniers neutralisés, l'un par l'acide acétique dilué, l'autre par le carbonate de chaux) une couleur rouge puis brun jaunâtre passant lentement au vert. La couleur est moins pure que dans les cas précédents.

GLUTEN. — Le même gluten de blé, qui m'avait servi dans l'étude des digestions pepsiques et pancréatiques, fut soumis en même temps à la digestion papaïque :

Gluten.....	5 gr.
Papaine.....	0 gr. 20.
Eau distillée.....	50 gr.
Chloroforme.....	XXX gouttes.

Au bout de 18 heures de digestion à 40°, il restait 0 gr. 699 de résidu non digéré (la pancréatine avait laissé 0 gr. 624, et la pepsine 0 gr. 260). La couleur que produisait, dans le liquide de digestion papaïque, l'addition de tyrosinase, était rouge, puis verte, plus pure qu'avec les digestions de la conglutine, moins pure qu'avec celles de la caséine ou de la fibrine.

CHAIR MUSCULAIRE. — Une digestion faite avec :

Viande de bœuf divisée	20 gr.
Eau	100 gr.
Papaïne	0 gr. 40
Chloroforme.....	XXX gouttes.

donne au bout de 6 heures un liquide qui devient, par la tyrosinase, rouge puis verdâtre, couleur beaucoup moins nette que dans les digestions de la caséine.

GÉLATINE. — Une solution de 10 gr. de gélatine dans 80 gr. d'eau distillée, faite à chaud, fut refroidie à 50°, puis additionnée d'une solution de 0 gr. 40 de papaïne dans 20 gr. d'eau, puis de 20 gouttes de chloroforme. Le liquide, maintenu à 40°, devint rapidement plus fluide. Après 24 heures de digestion, il abandonnait un faible dépôt grisâtre amorphe, et ne faisait plus prise par refroidissement. Avec le réactif *Russula*, on n'obtint qu'une très faible coloration rougeâtre passant au brunâtre très clair ; on n'obtint aucune teinte verte.

Si l'on compare l'action du réactif *Russula* sur les produits des digestions papaïques à celle du même réactif sur les produits pepsiques, il y a parallélisme absolu. Avec tous les albuminoïdes qui, par digestion pancréatique, produisent de la tyrosine, et dont les produits de digestion pepsique se colorent en rouge, puis en vert par la tyrosinase, le même réactif donne après leur digestion par la papaïne, une teinte rouge puis verte. La seule différence réside dans la pureté des couleurs produites : peut-être le rouge produit par la papaïne possède-t-il une légère pointe de carmin ; pour le vert, l'échelle de pureté des teintes peut être ainsi dressée : caséine et fibrine (vert bleuâtre), gluten, albumine coagulée (vert chlorophylle), cong lutine, chair musculaire (olive). La gélatine n'a donné aucune teinte nette ni intense, fait déjà observé avec les digestions pepsiques.

Neumeister ayant indiqué (1) que les produits de digestion papaïque des albuminoïdes sont identiques aux produits de

(1) Ueber die nächste Einwirkung gespannter Wasserdämpfe auf Proteine ; *Ztschr. f. Biol.*, XXVI, p. 57, 1889.

l'action, sur ces corps, de l'eau surchauffée, j'ai essayé l'action de la tyrosinase sur de semblables produits obtenus en chauffant la fibrine avec de l'eau à 130°, sous pression, pendant 1 h. 1/2 et 4 h. 1/2. Dans les deux cas, les liquides très légèrement colorés en rouge brunâtre, ont pris par la tyrosinase une teinte peu nette, rougeâtre, puis brunâtre clair, sans aucun mélange de vert. L'identité signalée par Neumeister n'est donc pas complète.

J'ai fait sur la matière verte obtenue à partir des digestions papaïques de la fibrine, et sur sa formation, quelques recherches que je vais exposer ici.

Si dans le but de faire cristalliser directement le chromogène dans les liquides de digestion papaïque de la fibrine, on évapore les liquides jusqu'à consistance extractive, on trouve, au microscope, au bout d'un certain temps, des cristaux de leucine et de tyrosine en très faible quantité, celle-ci (1) sous forme de cristaux en sabliers ou en faisceaux courts d'aiguilles peu nettes, et non sous forme de longues aiguilles comme dans le cas de digestions pancréatiques.

S'il se forme de la tyrosine dans les digestions papaïques, comment se fait-il que celle-ci ne donne pas avec la tyrosinase sa réaction caractéristique. C'est que la tyrosine est en trop faible quantité dans les digestions, et que la coloration est masquée, ou même l'action oxydante de la tyrosinase accaparée par le chromogène verdissant. L'expérience suivante le prouve :

J'additionnai, dans quatre tubes, un liquide de digestion papaïque neutre, de quantités différentes de solution aqueuse saturée de tyrosine (1/1900).

A. 5 c.c. de liquide papaïque + 5 c. c. d'eau distillée					
B. 5 c.c.	—		+ 5 c. c. de sol. de tyrosine		
C. 5 c.c.	—	+ 3 c. c.	—	+ 2 c. c.	—
D. 5 c.c.	—	+ 4,50	—	+ 0,50	—

A chacun de ces tubes on ajoutait 1/2^{cc} de solution de tyrosinase et 5 gouttes de chloroforme, et on agitait de temps en

(1) De la tyrosine a d'ailleurs été trouvée dans les digestions papaïques par Martin [*Journ. of. Physiol.*, t. V., p. 213 (1884), d'après Reynolds Green. *The soluble ferments and fermentation*].

temps. Au bout de 24 heures, A est devenu franchement vert, B rouge brunâtre, C olivâtre, D d'un vert presque aussi pur que A. D'ailleurs un tube contenant autant de tyrosine que D (0^{cc}50 de solution de tyrosine + 9^{cc}50 d'eau) avait pris, dans les mêmes conditions, une teinte rouge, puis brunâtre, très nettement perceptible (1). On voit donc que la tyrosine en faible quantité n'empêche pas la coloration verte de se produire.

Le pigment vert, que je nommerai pour plus de simplicité *vert papaïque* ne se laisse pas enlever par agitation avec l'éther, le chloroforme, l'éther acétique, l'alcool amylique. L'addition d'alcool aux liquides de digestion verdis détermine la formation d'un précipité vert, mais ne décolore pas complètement le liquide (le pigment vert est soluble dans l'alcool faible.) Comme le vert pepsique, le vert papaïque est détruit par les acides minéraux concentrés (acide sulfurique, acide azotique...). Comme le vert pepsique, il vire au rouge en réaction alcaline (ammoniaque, potasse, soude, chaux...); il redevient vert par addition d'acide. Le sous-acétate de plomb le précipite en vert sale, avec décoloration de la liqueur.

Mais au point de vue de la couleur, comme au point de vue des propriétés optiques (spectre d'absorption), le vert papaïque dérivé de la fibrine semble au premier abord différer du vert pepsique dérivé du même albuminoïde. En effet, le vert pepsique rappelle dans ce cas la couleur de la chlorophylle, ou mieux de la biliverdine; la couleur du vert papaïque est plus bleuâtre. Les solutions étendues de vert papaïque, examinées au spectroscope, donnent une bande d'absorption très nette dans l'orangé; si la solution est plus concentrée, de couleur plus foncée, la bande est plus étendue: elle est alors assez nettement limitée vers le rouge, et s'estompe dans le vert. Ce spectre d'absorption s'accorde parfaitement avec le dichroïsme rouge

(1) J'ai fait à ce propos quelques essais sur la sensibilité du réactif *Russula* à l'égard de la tyrosine. Si on fait agir ce réactif sur une solution de tyrosine à 0,25/1000, il se produit une couleur rouge, devenant noire (précipité noir.) Une solution à 0,05/1000 devient rouge, puis brune sans précipité; à 0,025/1000 elle devient rouge, puis brun jaunâtre clair; à 0,0125/1000, rouge très faible, puis jaunâtre sale. C'est là la limite de sensibilité de la réaction: avec une solution à 0,005/1000, on ne peut constater aucun changement de teinte.

des solutions de vert papaïque, même très étendues. Après traitement par un alcali, aucune bande ne peut être constatée; il y a seulement assombrissement de la partie la plus réfrangible du spectre. Ce spectre d'absorption n'avait pu être observé avec les solutions vertes d'origine pepsique. Il n'y avait qu'un assombrissement des deux extrémités du spectre, particulièrement du rouge. Elles présentaient cependant une teinte rouge sombre par réflexion. Mais si on traite les solutions vertes d'origine pepsique par le zinc et l'acide chlorhydrique, on obtient des liquides d'une intensité de couleur moins grande, mais d'un vert plus pur, se rapprochant de façon surprenante du vert d'origine papaïque, ayant le même dichroïsme et donnant également au spectroscopie une bande d'absorption dans l'orangé. En comparant spectroscopiquement la solution ainsi obtenue et une solution de vert papaïque diluée jusqu'à intensité égale de couleur, les spectres sont identiques.

Il semble donc que les matières colorantes produites par action de la tyrosinase sur les liquides de digestion papaïque ou pepsique soient identiques, et que, dans le cas de digestion pepsique, cette matière colorante soit accompagnée de substances colorantes différentes, qui, par réduction par le zinc et l'acide chlorhydrique, sont détruites les premières. Cette identité des verts pepsique et papaïque est évidente, quand on les obtient avec les produits de digestion de la caséine. En effet, dans ce cas, la couleur des liquides, la fluorescence rouge, et les spectres d'absorption, observés directement, sont identiques.

J'ai pu établir d'une autre façon cette identité : on sait que plusieurs pigments animaux, au nombre desquels l'oxyhémoglobine et l'urobiline, solubles dans l'eau, sont insolubles dans les solutions de sels concentrés. En particulier l'urobiline peut être précipitée de certaines urines par saturation avec le sulfate d'ammoniaque. J'ai essayé d'appliquer cette méthode à la séparation, à l'état impur, des verts papaïque et pepsique. Une digestion papaïque de fibrine, oxydée par la tyrosinase, et devenue parfaitement verte, additionnée d'un excès de sulfate d'ammoniaque pulvérisé, se trouble fortement, et il se forme, au bout d'un certain temps, un précipité floconneux vert foncé qui se réunit à la partie supérieure du liquide. Celui-ci est devenu

vert très pâle. On peut recueillir le précipité sur un filtre et le laver avec une solution saturée de sulfate d'ammoniaque. Ce précipité, desséché, mélangé de sulfate d'ammoniaque, constitue une poudre verte qui, traitée par ébullition avec les alcools éthylique et méthylique absolus, ou l'acétone, ne colore pas ces dissolvants. L'alcool à 90° le dissout faiblement, avec faible coloration verte, et dichroïsme rouge de la solution. L'acide acétique cristallisable, à la température du bain-marie bouillant, le dissout en partie, avec coloration verte très nette, et fluorescence rouge intense. Le liquide, filtré à chaud, n'abandonne par refroidissement qu'un faible dépôt verdâtre amorphe, mélangé de quelques cristaux de sulfate d'ammoniaque incolores. L'évaporation des solutions alcoolique ou acétique n'a donné aucun cristal vert.

Si l'on traite de même par le sulfate d'ammoniaque à saturation le liquide de digestion pepsique de la fibrine, verdi par la tyrosinase, on obtient également une décoloration partielle du liquide, et il se forme un précipité vert foncé. Celui-ci, recueilli par filtration, desséché, jouit des mêmes propriétés de dissolution que le vert papaïque. Il donne en particulier avec l'acide acétique à 100° une solution partielle vert pâle, mais possédant à un haut degré la fluorescence rouge si nette dans les solutions de vert papaïque.

Quant au liquide noir brunâtre, obtenu par action de la tyrosinase sur les digestions pancréatiques, traité par le sulfate d'ammoniaque à saturation, il se décolore presque complètement avec production d'un précipité brun-noir, qui, recueilli sur un filtre, desséché, n'abandonne même à chaud aucune matière colorante à l'acide acétique, ni à l'alcool à 90°. Le même fait se produit si on opère sur le précipité noir obtenu par action de la tyrosinase sur une solution aqueuse saturée de tyrosine.

Dans la séparation du vert papaïque par le sulfate d'ammoniaque, il y a précipitation des albumoses, qui souillent le précipité. En effet, les liquides de digestion papaïque, même après un assez long temps de digestion, contiennent encore des albumoses. J'ai essayé d'obtenir un vert papaïque débarrassé d'albumoses en employant le procédé suivant. Le liquide de digestion papaïque, verdi par la tyrosinase, est soumis à la digestion

pancréatique (0 gr. 20 de pancréatine pour 50 gr. de liquide). Une digestion de 2 jours à 40° n'a pas modifié la couleur verte du liquide, que celui-ci ait été bouilli au préalable, ou qu'on ait ajouté la pancréatine dans le liquide non bouilli. On aurait pu croire au premier abord que, le chromogène étant digéré par la trypsine avec formation de tyrosine (comme on le verra plus loin), le chromogène oxydé (vert papaïque) aurait pu être digéré de même en donnant de la tyrosine oxydée (noir tyrosinique); on voit qu'il n'en est rien. Par contre, les albumoses sont digérées par la pancréatine; car l'acide azotique, qui précipitait la digestion pepsique verdie par la tyrosinase ne donne aucun précipité dans le nouveau liquide. Si alors on emploie le sulfate d'ammoniaque à saturation, on obtient une matière verte qui ne doit pas contenir d'albumoses. Mais le vert papaïque ainsi séparé contient encore du sulfate d'ammoniaque. On peut l'en débarrasser de la façon suivante: le vert, dissous dans l'eau, est précipité par le sous acétate de plomb (il n'est pas précipitable par l'acétate neutre). Le précipité gris verdâtre (mélange de sulfate de plomb et de combinaison plombique du vert papaïque) est lavé, et agité avec de l'eau acidulée par l'acide sulfurique (l'hydrogène sulfuré ne peut être employé; il détruit la couleur des solutions de vert papaïque). On obtient alors par filtration, un liquide vert possédant le spectre caractéristique, mais un peu moins net que précédemment. La couleur verte elle-même est moins pure, les manipulations successives subies par le vert papaïque l'ayant sans doute altéré.

Telles sont les quelques propriétés que j'ai pu constater chez le vert papaïque. Quant à sa nature, je n'en puis rien dire, non plus que de celle du noir tyronisique. A plus forte raison, la nature du chromogène qui lui donne naissance est-elle également ignorée. Comme le chromogène pepsique, le chromogène papaïque résiste à l'ébullition en solution neutre; mais il est détruit par ébullition avec les acides (acide sulfurique 2/00). Une longue digestion papaïque ne le détruit pas, comme j'ai pu le constater par digestion, prolongée près de 6 mois à 40°, de fibrine sèche pulvérisée; mais la couleur obtenue par action de la tyrosinase est brun verdâtre, la digestion prolongée ayant augmenté la quantité de tyrosine contenue dans le liquide. Le

chromogène est au contraire détruit par digestion pancréatique. En effet, un liquide de digestion papaïque de la fibrine, abandonné 8 jours à 40° avec 0,10/100 de pancréatine laisse cristalliser de la tyrosine par refroidissement. D'autre part la tyrosinase colore le liquide en rouge, puis en noir. On pourrait peut-être croire que la coloration noire intense masque ici la coloration verte dérivée du chromogène papaïque ; il n'en est rien : car, si on précipite le pigment par le sulfate d'ammoniaque, et si on traite par l'acide acétique à chaud le produit desséché, le liquide ne se colore pas en vert, et ne possède pas la fluorescence rouge qui se produit par semblable traitement du vert papaïque ou du vert pepsique.

Il eût été intéressant de faire une étude comparée de l'action de la tyrosinase sur les produits des digestions opérées par les divers enzymes protéolytiques végétaux. Mais beaucoup n'ont pas l'activité de la papaïne ; les digestions qu'ils déterminent sont moins intenses ; par suite, les réactions obtenues avec la tyrosinase pourraient être douteuses. Un ferment digestif ayant été signalé dans le latex du *Ficus carica* L. par Bouchut (1), puis étudié par Hansen (2) et par Mussi (3), j'ai cru pouvoir retrouver ce ferment dans un autre *Ficus*, le *F. elastica* Roxb. Mais dans des expériences entreprises avec le latex de cette plante, il ne s'est produit aucune digestion de la fibrine, ni en milieu neutre, ni en milieu alcalin. Je me suis alors adressé au figuier lui-même. 18 gr. de feuilles fraîches ont été incisées, contusées, triturées avec 25 gr. d'eau chloroformée. Le liquide exprimé aussitôt fut précipité par 5 fois son poids d'alcool à 95°. Au bout de 5 minutes environ, le précipité fut recueilli sur un filtre, lavé à l'alcool, puis rapidement à l'éther, et desséché dans le vide. Le précipité grisâtre devint brun par dessiccation. Il pesait alors

(1) *C. R.*, XCI, p. 67, 1880.

(2) Ueber peptonisirende Fermente in den Secreten der Pflanzen ; *Sitzungsber. d. phys. med. Gesellsch. Würzburg*, 1884, n° 7 ; d'après *Jahresber. ueb. Thier-Chemie*, 1884.

(3) Cradina, a proteolytic enzyme in the Fig ; *L'Orosi*, Nov. 1890, p. 364, d'après *Pharm. Journ.*, (3) XXI, p. 560, 1890.

0 gr. 23. Il fut trituré et divisé dans 30 gr. d'eau chloroformée. Après quelques minutes de contact, le liquide fut filtré. 20^{cc} de ce liquide, brunâtre très clair, furent additionnés de 1 gr. de caséine et 10 gouttes de chloroforme ; un essai témoin fut fait avec de l'eau et de la caséine dans les mêmes proportions. Après 24 heures de digestion à 40°, le résidu non digéré pesait 0 gr. 785. Le résidu, dans le tube témoin, pesait 0 gr. 875. Il y avait donc eu une faible digestion. Le liquide de digestion, dont la matière colorante s'était en grande partie fixée sur la caséine, se colorait, après addition de tyrosinase, en rouge légèrement carminé, puis en vert peu intense, mais assez net. L'addition de tyrosinase dans le tube témoin, et dans le liquide primitif n'a donné aucune modification sensible de couleur. Il semble donc que le ferment protéolytique du figuier soit comparable à celui du *Carica*, quoique doué d'une moindre activité.

M. Bourquelot (1) a signalé dans l'*Aspergillus niger* la présence d'un ferment analogue à la trypsine, digérant en milieu neutre la fibrine et l'albumine coagulée, et liquéfiant la gélatine. MM. Bourquelot et Hérissé (2) ont constaté également dans certains champignons supérieurs la présence d'un ferment analogue, lui aussi, à la trypsine, déterminant dans le lait dégraissé la digestion de la caséine avec formation de tyrosine. Dans ce dernier cas, les liquides de digestion, additionnés de tyrosinase, se coloraient en rouge, puis en noir. L'analogie avec la trypsine animale était donc parfaite.

Il faut donc admettre que les ferments protéolytiques végétaux peuvent être groupés en deux classes. Les uns déterminent la formation, parmi les produits de digestion des albuminoïdes, d'un chromogène verdissant par la tyrosinase ; avec les autres il ne se forme que de la tyrosine. Si l'on avait le droit de tirer des conclusions générales du petit nombre de faits rapportés ici, on pourrait dire que les ferments analogues à la papaine existent chez certaines phanérogames adultes, tandis que les ferments analogues à la trypsine animale existent chez certains

(1) *Bull. Soc. myc. Fr.*, IX, p. 230, 1893.

(2) *Journ. pharm. et chim.*, (6), VIII, p. 448, 1898.

végétaux à croissance et assimilation rapides, comme sont les champignons. Et, par analogie, on pourrait supposer que les ferments protéolytiques des graines en germination, où la vie est active au plus haut point, sont, eux aussi, analogues à la trypsine animale, ce qui expliquerait la présence d'assez fortes quantités de tyrosine et de leucine dans les plantules de diverses phanérogames. Mais ce ne sont là encore que de simples hypothèses.

CHAPITRE V

*Emploi du réactif **Russula** pour étudier l'action de la chaleur sur les ferments protéolytiques.*

L'action du réactif *Russula* sur les produits des digestions par la pepsine, la trypsine et la papaïne, étant bien établie dans le cas des digestions normales, où les ferments n'ont subi aucune modification, j'ai cherché si l'action préalable de la chaleur sur ces ferments modifiait le processus de digestion, et les circonstances de formation des chromogènes. Dans tous les cas, avec les ferments ayant subi l'action de la chaleur en l'absence d'eau, ou chauffés en solution aqueuse, j'ai pu, tant que le pouvoir digestif n'était pas entièrement annihilé, constater la formation des chromogènes qui se produisent dans les digestions normales : la quantité seule de ces chromogènes décroît avec l'activité fermentaire.

I. PEPSINE. — A. ACTION DE LA CHALEUR A SEC.

Dittmar Finkler (1) avait remarqué que la pepsine sèche du commerce était moins active, vis-à-vis de l'albumine coagulée, que la pepsine récemment préparée, non desséchée ; les digestions déterminées par la première s'arrêtaient à la formation de parapeptone syntonine, quelle que fût d'ailleurs la quantité

(1) Ueber verschiedene Pepsinwirkungen. — *Pflüger's Archiv*, X, p. 372, 1875.

de pepsine employée ; celles déterminées par la seconde allaient jusqu'à la production de peptones. E. Salkowski (1) attribue la formation de syntonine à l'acide chlorhydrique seul, la pepsine essayée par Finkler étant évidemment inactive. Finkler (2) relève l'observation de Salkowski et constate expérimentalement que la pepsine, chauffée pendant sa dessiccation, se transforme, déjà à 40°, plus sûrement à 60° ou 70°, en *isopepsine*, douée d'un pouvoir digestif moins profond (terme ultime formé = syntonine). Dans des essais simultanés, l'acide chlorhydrique ne formait avec l'albumine que très peu de syntonine, tandis que l'isopepsine dissolvait totalement l'albumine ; la syntonine formée dans ce dernier cas n'était plus digestible par l'isopepsine, mais l'était par la pepsine. D'autre part, d'après Al. Schmidt (3), la pepsine à l'état sec peut être chauffée une heure à 110° sans perdre son pouvoir digestif vis-à-vis de l'albumine coagulée. E. Salkowski (4) constate en effet que la pepsine chauffée à sec 3 ou 4 heures à 100° ne diffère pas de la même pepsine non chauffée. J'ai contrôlé ces faits, et j'ai pu constater par l'emploi du réactif *Russula*, que le chromogène pepsique se forme toujours en même proportion apparemment, que la pepsine ait été chauffée à sec, ou qu'elle n'ait pas subi l'action de la chaleur. Le processus digestif ne semble donc nullement modifié.

Des essais de digestion furent menés de front à 45-50° d'après la formule suivante.

Fibrine essorée (5).....	20 gr.
Pepsine	1 gr.
Acide chlorhydrique officinal	1 gr.
Eau distillée chloroformée.....	100 gr.

(1) *Centralblatt f. die medic. Wissensch.*, XXI, p. 383, 1876.

(2) Ueber das Isopepsin. *Pflüger's Archiv*, XIV, p. 128, 1876.

(3) Bemerkung zu Gautier's Fibringerinnungsversuch. *Centralbl. f. d. med. Wissensch.*, 1876, N° 29, d'après *Jahresb. üb. Thierchemie*, VI, p. 273, 1876.

(4) Ueber die Wirkung erhitzter Fermente und das Propepton. *Virchow's Archiv*, LXXXI, p. 552, 1880, d'après *Jahresb. über Thierchemie*, X, p. 24, 1880.

(5) Pour chaque double essai, la fibrine avait été prélevée dans une même masse de fibrine essorée ; c'est dire qu'elle contenait, dans les deux cas, sensiblement la même quantité de matière sèche. J'ai opéré ainsi dans tous les essais avec témoin.

Pour l'un de ces essais, la pepsine en poudre, aussi sèche que possible, avait été pesée, puis chauffée quelque temps à 50°, et finalement portée à 100° pendant 3 heures et demie. Dans l'autre essai, la pepsine avait été employée non chauffée. La fibrine se dissolvait aussi rapidement dans les deux cas. De plus, la digestion fut complète dans les deux cas en 6 heures, c'est-à-dire qu'au bout de ce temps l'acide azotique ne troublait plus les liquides de digestion. Les deux liquides, neutralisés, donnèrent aussi la même réaction avec la tyrosinase du *Russula delica*. La seule différence, très faible, résidait dans les déviations observées au polarimètre, 12 heures après la fin de l'opération, les liquides étant abandonnés à la température du laboratoire :

Digestion par la pepsine chauffée	$\alpha = -6^{\circ}32'$
— — — non chauffée	$\alpha = -6^{\circ}10'$

L'action de la chaleur sèche (100°) sur la pepsine s'était donc traduite par un très léger affaiblissement du pouvoir digestif, sans doute dû à une dessiccation malgré tout imparfaite ; mais elle n'avait modifié en rien le processus digestif.

B. ACTION DE LA CHALEUR SUR LA PEPSINE EN SOLUTION.— Dans chaque essai, la pepsine était chauffée une demi-heure exactement à température fixe, selon le mode opératoire suivant. Supposons qu'il s'agisse d'essayer l'action d'une température de 60°. On pèse 1 gr. de pepsine dans une capsule de verre. D'autre part, on fait chauffer au bain-marie un flacon taré de 125^{cc} et un ballon contenant de l'eau distillée. Un thermomètre plonge dans le ballon, un autre dans le bain-marie. Quand l'eau distillée a atteint la température de 60°, on sort le flacon ; on y verse la pepsine en poudre, on lave la capsule à plusieurs reprises avec l'eau à 60°, on verse ces eaux de lavage dans le flacon et on complète avec l'eau à 60° le poids de 91 gr. Après avoir agité pour dissoudre la pepsine, on porte le flacon au bain-marie. Il a subi un abaissement de température variant de 5 à 10°. On chauffe fortement le bain-marie jusqu'à ce que la solution atteigne la température de 60°, ce qui n'exige que deux ou trois minutes. A ce moment, on règle la température du bain-marie par addition convenable d'eau froide, et on maintient 1/2 heure le liquide à 60°. Deux thermomètres, l'un dans

le bain-marie, l'autre dans le liquide, servent à diriger l'opération. Si l'on surveille bien l'opération, l'écart maximum de température atteint à peine un demi-degré. Au bout d'une demi-heure, le flacon est plongé dans l'eau froide. Après refroidissement, on complète le poids primitif pour remplacer l'eau évaporée. En opérant ainsi, à aucun moment la pepsine n'est portée à une température supérieure à 60°, et, d'autre part, le temps pendant lequel elle subit l'action de la chaleur est aussi voisin que possible de 30 minutes.

On ajoute alors de la fibrine essorée (20 gr.) et 10^{cc} d'acide chlorhydrique officinal dilué au 1/10 (soit 1 gr. d'acide officinal.) On prépare en même temps un deuxième essai analogue, avec la pepsine non chauffée, et on porte à 45°.

Voici les résultats obtenus :

I. — *Pepsine chauffée à 60°.*

Dissolution de la fibrine en 1/2 heure.
Trouble par AzO³H après 6 heures de digestion.

Déviation au polarimètre $\alpha = -7^{\circ}20'$.
Par la tyrosinase, après neutralisation : coloration rouge, puis verte, intense.

II. — *Pepsine chauffée à 65°.*

Dissolution de la fibrine en 1/2 heure.
Trouble fortement par AzO³H au bout de 6 heures.

Déviation au polarimètre $\alpha = -6^{\circ}50'$.
Par la tyrosinase, après neutralisation : couleur rouge, puis verte, intense.

III. — *Pepsine chauffée à 68°.*

Dissolution de la fibrine encore incomplète après 3 heures de digestion.

Trouble très fortement par AzO³H au bout de 6 heures.

Déviation au polarimètre $\alpha = -6^{\circ}46'$.
Par la tyrosinase, après neutralisation : couleur rouge, puis verte, peu intense, avec trouble.

Pepsine non chauffée.

Id.

Pas de trouble.

$\alpha = -6^{\circ}30'$

Id.

Pepsine non chauffée.

Id.

Pas de trouble.

$\alpha = -6^{\circ}26'$

Id.

Pepsine non chauffée.

Dissolution complète en 1/2 heure.

Pas de trouble.

$\alpha = -6^{\circ}$

Coloration rouge, puis verte, intense.

Ces essais prouvent donc que l'action prolongée de la chaleur détermine une diminution de l'activité du ferment en solution. D'autre part, on voit que la température mortelle de la pepsine en solution aqueuse (1) est voisine de 68°, et que, aux températures inférieures, déjà à 60°, la pepsine subit un affaiblissement, marqué par la rotation plus forte qu'on observe avec les liquides de digestion.

Au moment où je publiais ces essais (2), M. J. Effront, se plaçant à un autre point de vue, arrivait à des résultats semblables, pour l'action de la chaleur sur le pouvoir dissolvant de la pepsine (3). Il évaluait le temps que mettaient, pour déterminer la transparence d'une suspension d'albumine coagulée, plusieurs échantillons de pepsine chauffés en solution neutre à diverses températures, et constatait que si une pepsine non chauffée dissout l'albumine en 60 minutes, la même pepsine, chauffée 1 heure à 65°, produit le même effet en 65 minutes. Chauffée 6 heures à 65°, elle exigeait 80 minutes de digestion ; si elle avait subi l'action d'une température de 70° pendant 1 heure, il fallait 246 minutes. 6 heures d'exposition à 70° détruisaient totalement l'action.

La pepsine semble d'ailleurs mieux résister à la chaleur en simple solution aqueuse qu'en solution physiologique. Ad. Mayer (4) a indiqué en effet comme température mortelle de la pepsine en solution chlorhydrique (6° d'acide chlorhydrique fumant par litre) la température de 55-60°. Mayer plongeait plusieurs tubes contenant les solutions chlorhydriques de pepsine dans un bain-marie chauffé de telle façon que la température montât de 1° en 3 minutes ; il retirait successivement les tubes, de 5 en 5 degrés, et déterminait le temps que mettait à s'y dissoudre un petit cylindre d'albumine coagulée pesant 8 milligrammes. Il est facile de voir que les divers termes de cette

(1) La solution avait une réaction presque neutre ; à peine légèrement acide.

(2) *Journ. Pharm. et Chim.*, (6), X, p. 105, 1^{er} août 1899.

(3) *Bull. Soc. chim. Paris*, (3), XXI, p. 687, 20 juillet 1899.

(4) *Die Lehre von den chemischen Fermenten (Enzymologie)*, Heidelberg, 1882, p. 27.

expérience ne sont pas comparables, la pepsine chauffée à 55°, par exemple, ayant subi 15 minutes de plus que celle chauffée à 50° l'action plus nuisible d'une chaleur plus forte. Aussi est-il probable que la température mortelle qu'il indique est trop faible. J'ai constaté que l'action d'une température de 61° soutenue une demi-heure en milieu contenant 1 % d'acide chlorhydrique officinal (dans le cas présent, exactement 0,35 % HCl) ne détruit pas totalement la pepsine, et qu'après 12 heures de contact à 45° avec la fibrine, une partie de cette dernière était dissoute; dans le même essai, sans pepsine, la fibrine était gonflée, mais nullement dissoute.

II. TRYPSINE.

Les essais ont été faits avec la pancréatine médicinale (Suppl. Codex 1895). L'action de la chaleur n'a, bien entendu, été étudiée sur ce produit, qu'au point de vue de son pouvoir protéolytique : l'étude des autres ferments qu'il contient ne rentre pas dans le cadre de ce travail.

A. ACTION DE LA CHALEUR SUR LA PANCRÉATINE SÈCHE. — C'est une opinion adoptée par les auteurs, que la trypsine n'est pas altérée par une longue exposition à une température même supérieure à 100°, du moins tant qu'il n'y a pas destruction de la matière organique. En effet, Hüfner (1) a démontré que les ferments du pancréas, secs, peuvent supporter plusieurs heures la température de 100° sans être détruits. Al. Schmidt (2) observa que la température de 100-112°, soutenue 5/4 d'heure n'amène pas de modification de la trypsine. D'après E. Salkowski (3),

(1) Untersuchungen über ungeformte Fermente und ihre Wirkungen; *J. f. prakt. Chemie*, V, p. 372, 1872.

(2) Bemerkung zu Gautier's Fibringerinnungsversuch; *Centralbl. f. d. med. Wissensch.*, 1876, N° 29, d'après *Jahresb. üb. Thier-Chemie*, VI, p. 273, 1876.

(3) Verhalten des Pancreasfermentes bei der Erhitzung. *Virchow's Archiv*. LXX, p. 158, 1877, d'après *Jahresb. üb. Thier-Chemie*, VII, p. 286, 1877.

elle résiste à la température de 160° prolongée 1 heure et demie, la température de 170° étant mortelle.

J'ai repris l'étude de cette question en faisant intervenir l'action du réactif *Russula* sur les produits de digestion ; j'ai vérifié de la sorte que la digestion déterminée par une pancréatine chauffée allait jusqu'à la production de tyrosine. La pancréatine sur laquelle j'ai opéré fut desséchée aussi parfaitement que possible (conservée 6 jours dans le vide sulfurique), puis chauffée à 100° pendant 3 heures et demie. Deux digestions de fibrine furent mises en train, à 45°, l'une avec cette pancréatine chauffée, l'autre avec la même pancréatine non chauffée, et avec les mêmes doses de substances :

Fibrine.....	20 gr.
Pancréatine.....	0 gr. 40
Eau distillée chloroformée.....	100 gr.

Au bout de 10 heures environ de digestion, les deux liquides ne troublaient plus par l'acide azotique, et donnaient au polarimètre la même déviation ($-3^{\circ}12'$), la dissolution de la fibrine étant d'ailleurs complète dans les deux cas, sauf le résidu de dyspeptones. La réaction donnée par la tyrosinase fut identique pour les deux liquides : même intensité et même rapidité d'apparition des teintes, rouge puis noire. De plus, les liquides filtrés commençaient dès le lendemain à déposer des cristaux de tyrosine, et, au bout de 8 jours, j'ai pu séparer, par filtration et lavage rapide à l'eau, des quantités à peu près égales de tyrosine (0 gr. 12 et 0 gr. 115). Une chaleur sèche de 100° ne détermine donc aucune modification ultérieure dans l'action de la pancréatine sur la fibrine, ni qualitativement, ni quantitativement.

B. ACTION DE LA CHALEUR SUR LA PANCRÉATINE EN SOLUTION. —

Des essais du même ordre furent entrepris sur la pancréatine en solution, ayant subi une demi-heure, d'après une méthode analogue à celle indiquée précédemment, les températures de 60°, 57°, 55°. Voici les résultats obtenus (température de digestion 45-50°) :

I. — *Pancréatine chauffée à 60°.*

Dissolution de la fibrine presque nulle en 8 heures.

Déviatiou observée au polarimètre $\alpha = -36'$ (1).

Par la tyrosinase, faible réaction colorée, plus forte cependant qu'avec une simple solution de pancréatine au même titre.

II. — *Pancréatine chauffée à 57°.*

Au bout de 10 heures, faible dissolution de la fibrine.

$\alpha = -1^{\circ}22'$

Tyrosinase : Réaction tyrosinique nette, plus forte que dans le cas précédent, plus faible que dans l'essai témoin.

III. — *Pancréatine chauffée à 55°.*

En 8 heures, incomplète dissolution de la fibrine (plus forte que dans le cas précédent).

$\alpha = -1^{\circ}46'$.

Tyrosinase : réaction plus intense que dans le cas précédent, moins forte que dans l'essai témoin.

Pancréatine non chauffée.

Digestion complète en 8 heures (pas de trouble par AzO^3H).

$\alpha = -2^{\circ}58'$.

Réaction fortement colorée. De plus, dépôt de tyrosine à la longue.

Pancréatine non chauffée.

Digestion complète (pas de trouble par AzO^3H).

$\alpha = -2^{\circ}44'$.

Réaction tyrosinique intense. De plus, dépôt de tyrosine.

Pancréatine non chauffée.

Digestion complète (pas de trouble par AzO^3H).

$\alpha = -2^{\circ}27'$.

Réaction intense. De plus, dépôt de tyrosine.

Ces observations montrent que le processus digestif n'est pas modifié par l'action de la chaleur sur la pancréatine en solution, mais qu'il y a simplement diminution de l'activité fermentaire. Ce ralentissement d'action est déjà provoqué par des températures assez basses. Heidenhain (2) a montré que la trypsine chauffée 24 heures à 35° en solution aqueuse digère moins rapidement la fibrine, que ne fait la même trypsine non chauffée. D'après les essais ci-dessus mentionnés, la température mortelle de la trypsine en solution aqueuse (3) est voisine

(1) Cette faible déviation n'est pas entièrement attribuable à la pancréatine. Il y a eu réellement digestion ; car un essai fait à blanc avec la pancréatine seule, sans fibrine, a donné une déviation de -6 à $-8'$; un essai avec la fibrine seule, sans pancréatine, a donné une déviation de $-10'$.

(2) Beiträge zur Kenntniss des Pankreas. *Pflüger's Archiv.*, X, p. 579, 1875.

(3) La réaction de la solution est à peine légèrement acide.

de 60° ; mais l'affaiblissement est déjà net à 55°. O. Lœw (1) avait indiqué comme température mortelle celle de 69-70° : cette divergence est attribuable à des différences dans le mode de préparation du ferment et dans la durée d'action de la chaleur. Quoiqu'il en soit, il y a là un avertissement, pour les fabricants, d'opérer la dessiccation à température aussi basse que possible dans la préparation de la pancréatine.

III. — PAPAÏNE.

Des essais analogues, entrepris avec la papaïne, m'ont conduit, pour ce ferment, à des résultats semblables.

A. — ACTION DE LA CHALEUR SUR LA PAPAÏNE SÈCHE. — 0 gr. 40 de papaïne en poudre, après être restés un jour dans le vide sulfurique, ont été chauffés 3 heures à 100°. Deux digestions furent faites, l'une avec une papaïne non chauffée (A), l'autre avec la papaïne ainsi chauffée (B), d'après les données suivantes :

Papaïne.....	0 gr. 40.
Eau distillée.....	100 gr.
Fibrine essorée.....	20 gr.
Chloroforme.....	XXX gouttes.

Après 24 heures de digestion à 40°, les liquides furent mis à refroidir et filtrés sur des filtres doubles. Les rotations produites par les liquides, examinés en tubes de 20 cent., étaient, pour A—2°44', pour B—2°38'. D'autre part, 5^{cc} de chacun des deux liquides laissèrent comme résidu fixe : A, 0 gr. 171 ; B, 0 gr. 158, et les pouvoirs rotatoires des substances en solution, calculés d'après ces données, se trouvaient être : A,—39°,95 ; B,—41°,66. Quant aux résidus non digérés, recueillis sur les filtres, ils pesaient, après lavage et dessiccation : A, 2 gr. 204, B, 2 gr. 275. On voit que l'action digestive s'est montrée un peu plus faible en B qu'en A, comme l'indiquent les quantités des substances dissoutes, leurs pouvoirs rotatoires et les quantités de résidu non digéré. Mais, la différence n'étant pas considérable, on

(1) Ueber die chemische Natur der ungeformten Fermente. *Arch. f. d. ges. Phys.*, XXVII, p. 203, d'après *Jahresb. üb. Thier-Chemie*, 1882.

pouvait attribuer ce fait à la dessiccation imparfaite de la papaïne ayant servi à l'essai B. Et, en effet, dans une 2^e série d'expériences, où la papaïne avait au préalable séjourné quatre jours dans le vide sulfurique, les chiffres trouvés furent les suivants :

	A	B
Rotation.....	— 2° 30'	— 2° 30'
Résidu d'évaporation de 5 ^{cc}	0 gr. 153	0 gr. 152
Résidu de digestion.....	2 gr. 360	2 gr. 472
Pouvoir rotatoire.....	— 40°, 84	— 41°, 11

On peut donc dire que la chaleur n'a pas altéré le pouvoir digestif de la papaïne ; d'ailleurs Würtz (1) avait déjà remarqué qu'un échantillon de papaïne, chauffé à sec à 105° pendant un certain temps, pouvait encore dissoudre la fibrine :

Quant à la réaction produite par addition de tyrosinase aux deux liquides, elle fut identique : dans les deux cas, il y eut formation d'une teinte rouge, puis verte. La chaleur, agissant sur la papaïne sèche, ne modifie donc pas le pouvoir que possède ce ferment de former, par digestion de la fibrine, un chromogène spécial.

B. — ACTION DE LA CHALEUR SUR LA PAPAÏNE EN SOLUTION. — Plusieurs séries de digestion ont été faites comparativement avec de la papaïne chauffée, en suivant la méthode précédemment indiquée, pendant une demi-heure, aux températures de 55°-60°-65°,..... 80°-82°,5-83°,5 et la même papaïne n'ayant pas subi l'action de la chaleur. Les essais étaient faits à 40° selon les proportions données plus haut. Au bout de 24 heures de digestion, et après refroidissement, on évaluait les rotations produites par les liquides, les quantités des substances non digérées et des substances dissoutes dans des volumes déterminés des liquides ; on calculait, d'après ces données, les pouvoirs rotatoires moyens de l'ensemble des substances en solution, et on essayait l'action de la tyrosinase sur les liquides de digestion.

Le pouvoir rotatoire des substances dissoutes par la papaïne non chauffée était en moyenne de —40°, valeur variable suivant

(1) Sur la papaïne. Contribution à l'histoire des ferments solubles. *C. R.*, XC, p. 1379, 1880.

que la fibrine avait été plus ou moins complètement essorée. Il croissait régulièrement lorsque la papaïne employée avait été chauffée à des températures de plus en plus élevées, atteignait $-41^{\circ},99$ pour la papaïne chauffée à 75° , et s'élevait à $-47^{\circ},20$ pour la papaïne chauffée à 80° . Avec une papaïne ayant subi l'action d'une température de $82^{\circ},5$, il était de $-49^{\circ},82$, et de $-52^{\circ},38$ dans le cas où la papaïne avait été chauffée à $83^{\circ},5$.

Pour les résidus de digestion, recueillis sur filtres tarés, puis lavés à l'eau et pesés après dessiccation, la progression était analogue :

	Résidu non digéré.
Papaïne non chauffée.....	1 gr. 80 en moyenne
— chauffée à 70°	2 gr. 14
— chauffée à 80°	2 gr. 97
— chauffée à $81^{\circ},5$	4 gr. 119
— chauffée à $82^{\circ},5$	4 gr. 955
— chauffée à $83^{\circ},5$	4 gr. 987

Si l'on considère les quantités du résidu fixe laissé par évaporation de 5^{cc} des liquides de digestion, la progression est inverse :

	Résidu d'évaporation de 5^{cc}
Papaïne non chauffée.....	0 gr. 160 en moyenne
— chauffée à 75°	0 gr. 157
— chauffée à 80°	0 gr. 120
— chauffée à $82^{\circ},5$	0 gr. 058
— chauffée à $83^{\circ},5$	0 gr. 052

D'après la variation rapide de ces différentes valeurs entre 80° ou $81^{\circ},5$ et $82^{\circ},5$, on peut admettre comme température de destruction de la papaïne, dans les conditions des expériences, la température de 82° (1) ; cette opinion est d'ailleurs confirmée par l'examen de la fibrine à la fin des digestions. En effet, avec la papaïne chauffée à des températures inférieures à 75° , la désagrégation de la fibrine était totale en 24 heures. La fibrine digérée par une papaïne chauffée à 80° était faiblement désagrégée, peu déformée, mais tassée, sans consistance ; digérés

(1) En 1878, Wittmack avait fait connaître à la Société d'histoire naturelle de Berlin, que le ferment du Papayer différait de la Pepsine en ce qu'il conservait son action à une température de $60-65^{\circ}$. (D'après Dujardin-Baumetz et Egasse. Les plantes médicinales. Paris, 1889, p. 517.)

par la papaïne chauffée à 81°,5, les fragments de fibrine n'étaient ramollis que superficiellement ; enfin la fibrine restait à peu près inaltérée après séjour de 24 heures dans la solution de papaïne chauffée à 82°,5.

Quant à la coloration produite par la tyrosinase, sauf l'intensité, elle fut identique dans tous les cas. Même alors que l'action digestive était des plus faibles, on pouvait obtenir une teinte rouge, puis verte, peu intense, mais très nette. Il est donc évident que l'action de la chaleur n'a pour effet que l'amointrissement ou la suppression du pouvoir digestif du ferment, mais n'entraîne aucune modification du processus digestif ; à ce point de vue, on peut remarquer qu'il y a analogie complète entre les trois ferments protéolytiques, pepsine, trypsine, papaïne.

CHAPITRE VI

De l'action qu'exercent l'un sur l'autre les trois ferments protéolytiques : pepsine, trypsine, papaïne.

L'action des ferments digestifs l'un sur l'autre est un des côtés les plus intéressants de leur histoire. Quand, par exemple, on met en présence, dans un milieu favorable à l'action pepsique, de la pepsine et de la trypsine, celle-ci se trouve-t-elle détruite, soit partiellement, soit totalement ? Y a-t-il d'autre part, dans un milieu favorable à l'action trypsique, amoindrissement du pouvoir digestif de la pepsine ? Que deviennent, dans une même solution, la papaïne et la trypsine, qui toutes deux agissent dans un milieu de même réaction ? La papaïne résiste-t-elle à la pepsine digérante, et réciproquement peut-on mettre la pepsine en présence de la papaïne en solution neutre sans qu'elle éprouve un amoindrissement de son activité digestive ? Il y a là, comme on le voit, plusieurs points dont l'intérêt s'accroît encore si l'on considère que la papaïne et la pancréatine, employées comme médicaments, se trouvent forcément mises en contact avec le suc gastrique, et que d'autre part la pepsine et la pancréatine se trouvent souvent associées, plutôt à tort, dans des préparations pharmaceutiques. Mais un tel sujet présente autant de difficultés qu'il possède d'attraits. Si l'on peut à volonté, dans une solution de trypsine et de pepsine, rendre actif l'un quelconque de ces ferments, et entraver du même coup l'action digestive de l'autre, soit en acidifiant, soit en neutralisant la liqueur, il n'en est plus de même dans le cas de

la papaïne et de la trypsine, qui, toutes deux, agissent en milieu neutre ou légèrement alcalin, et qui, toutes deux, sont influencées défavorablement par les acides déjà à des doses assez faibles. Aussi les actions qu'exercent l'une sur l'autre la pepsine et la trypsine sont-elles déjà connues, tandis que l'on n'en semble pas s'être occupé jusqu'à présent de ce que deviennent la papaïne et la trypsine réunies dans un même milieu. J'ai pu aborder cette question en faisant usage des données précédemment acquises au cours de ce travail. Auparavant, j'exposerai rapidement ce qui a trait à l'action réciproque de la trypsine et de la pepsine.

I. — PEPSINE ET TRYPSINE.

Kühne (1) a observé en 1876 que la trypsine est détruite quand on la soumet à la digestion pepsique. Karl Mays (2) a repris la question et constaté qu'en milieu contenant 0,5/1000 HCl, la trypsine est détruite par action de la pepsine. Cette opinion est soutenue également par Ewald (1880) et Langley (3) (1881), puis par Baginsky (4).

Ce dernier constate en outre que la pepsine n'est pas détruite par la trypsine en solution alcaline ; toutefois son pouvoir digestif semble amoindri. William Roberts (5) ayant remarqué que la trypsine, laissée 1 heure en contact à 40° avec un milieu contenant 2/1000 HCl, n'a rien perdu de son pouvoir digestif après neutralisation de la liqueur, répète l'expérience en présence d'acide lactique, en proportion équivalente, et de pepsine : après neutralisation, le liquide n'a plus aucune action digestive.

J'ai fait à ce sujet deux essais que je vais exposer ici.

(1) Cité par Mayer. *Enzymologie* p. 97. — Toute cette bibliographie est empruntée à M. Bourquelot ; *Recherches sur les phénomènes de la digestion chez les mollusques céphalopodes*. Paris, 1885.

(2) Ueber die Wirkung von Trypsin in Säuren, und von Pepsin und Trypsin aufeinander. *Untersuch. aus d. physiol. Inst. d. Univ. Heidelberg* ; p. 378-393, 1880.

(3) Cités par Baginsky.

(4) Ueber das Vorkommen und Verhalten einiger Fermente ; *Ztschr. f. physiol. Chemie*, VII, p. 209, 1883.

(5) Les ferments digestifs, traduction française, p. 55.

1° *Action de la pepsine sur la trypsine.* — On prépare la solution suivante :

Pepsine.....	0 gr. 10
Pancréatine.....	0 gr. 10
Eau distillée.....	23 gr.
Acide chlorhydrique dilué au 1/10	2 ^{cc} ,5
Chloroforme.....	XXX gouttes.

Dans un flacon témoin, on fait bouillir 0 gr. 10 de pepsine dans 23 gr. d'eau ; puis, après refroidissement et après avoir remplacé l'eau évaporée, on ajoute la pancréatine, l'acide chlorhydrique et le chloroforme. Les deux flacons contiennent donc les mêmes quantités des diverses substances, mais dans l'un d'eux la pepsine a été tuée. La proportion d'acide chlorhydrique vrai qu'ils contenaient était exactement 3,06 p. 1.000. On les porte 2 heures à l'étuve à 40°, puis on les abandonne 20 heures à la température du laboratoire. Alors, on neutralise exactement leur contenu par addition de la même quantité de potasse normale (2^{cc}1), déterminée à l'avance sur une simple dilution, au même titre, d'acide chlorhydrique. On ajoute ensuite à chacun 5 gr. de fibrine cuite, essorée, et on laisse en contact 24 heures à 40°. La pepsine ne peut agir dans ces conditions (milieu neutre). Mais dans aucun des deux flacons il n'y eut de digestion : le résidu non digéré, dans le premier flacon, après lavage et dessiccation, pesait 2 gr. 089. Dans le deuxième flacon, où la pancréatine n'avait subi que l'action de l'acide chlorhydrique, il était de 2 gr. 050 (1). La fibrine cuite, essorée, contient d'ailleurs environ 40 0/0 de matière sèche.)

La destruction de la trypsine dans une solution de pepsine à 3/1000 HCl est donc attribuable à l'acidité du liquide.

2° *Action de la trypsine sur la pepsine.* — Deux liquides sont préparés tous deux avec :

Pepsine.....	0 gr. 10
Pancréatine.....	0 gr. 10
Eau distillée.....	25 gr.
Chloroforme.....	XXX gouttes

(1) La pancréatine employée, ayant d'ailleurs servi précédemment pour divers essais, était cependant active.

Mais, dans l'un, on avait soin de faire bouillir au préalable la pancréatine dans l'eau, et de n'ajouter les autres substances qu'après refroidissement, et après avoir remplacé l'eau évaporée. Après séjour de 2 heures à 40°, et de 15 heures à la température ordinaire, on ajoute aux liquides 2^{cc},5 d'acide chlorhydrique dilué au 1/10 et 5 gr. de fibrine cuite, essorée. On laisse digérer 10 heures à 40°. On constate alors que le pouvoir digestif de la pepsine est amoindri par le fait de son contact avec la pancréatine : tandis que, dans le second flacon, le résidu non digéré pesait 0 gr. 700, et que l'évaporation de 5^{cc} du liquide de digestion laissait un résidu sec de 0 gr. 085, on trouvait dans le second flacon 0 gr. 991 de résidu de digestion, et, pour 5^{cc} de liquide, 0 gr. 037 de substances dissoutes. La pancréatine (trypsine) agit donc sur la pepsine en milieu neutre en diminuant son pouvoir digestif, ainsi que l'avait constaté Baginsky.

II. — TRYPSINE ET PAPAÏNE.

On peut se poser cette double question : 1° La papaïne détruit-elle totalement la trypsine, ou bien la trypsine détruit-elle totalement la papaïne ; 2° Y a-t-il affaiblissement, destruction partielle des ferments, l'un par l'autre ?

Pour résoudre la première question, la tyrosinase trouve de nouveau son application. On fait digérer un certain temps, 9 heures, à 40°, une solution chloroformée de pancréatine et de papaïne, ainsi composée :

Pancréatine.....	0 gr. 10
Papaïne.....	0 gr. 10
Eau distillée.....	25 gr.
Chloroforme	XXX gouttes

Après avoir ajouté 5 gr. de fibrine au liquide, on maintient le mélange à 40° pendant 12 heures. Le liquide de digestion est ensuite additionné de tyrosinase. On obtient ainsi la couleur rouge puis noire qui se produit lorsqu'on soumet à la digestion pancréatique la fibrine, ou les produits de sa digestion par la papaïne : la pancréatine n'est donc pas détruite totalement par la papaïne.

La même expérience, un peu modifiée, permet de voir s'il y a eu destruction de la papaïne par la pancréatine. Il suffit, en effet, avant d'ajouter la fibrine dans l'expérience précédente, de porter la solution des deux ferments une demi-heure à la température de 65° : la pancréatine se trouve presque complètement détruite ; la papaïne résiste, sa température de destruction étant en effet voisine de 82°, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Dans ce cas, après addition de fibrine et après digestion, on constate que les produits de digestion deviennent rouges, puis verts, par la tyrosinase : la papaïne n'a donc pas été détruite par l'action de la pancréatine.

Il faut maintenant chercher s'il y a eu affaiblissement ou destruction partielle des ferments. On doit renoncer de prime abord à étudier l'affaiblissement que peut produire sur la pancréatine la papaïne en digestion. En effet, étant donné le mélange des deux ferments, il faudrait, pour évaluer le pouvoir digestif de l'un (trypsine), annihiler l'autre (papaïne.) La chose est impossible, les conditions d'action des deux ferments étant à peu près les mêmes, et la pancréatine (trypsine) étant moins résistante que la papaïne à l'action de la chaleur. J'ai tenté d'étudier l'action de la pancréatine sur la papaïne. La solution des ferments avait été portée 5 heures à 40°, puis, après 1/2 heure de chauffage à 65°, pour détruire la trypsine, elle avait été additionnée, comme plus haut, de fibrine fraîche (5 gr.). Un flacon témoin, contenant un mélange identique, mais où la papaïne avait été préalablement bouillie, subit en même temps les mêmes traitements. Chose singulière au premier abord, après 12 heures de digestion à 40°, la digestion était moins intense dans le second flacon, où la papaïne n'avait pas subi l'action de la pancréatine, comme cela ressort des données suivantes :

	1 ^{er} flacon	2 ^e flacon
Résidu non digéré.....	0 gr. 714	0 gr. 850
Résidu d'évaporation de 10 ^{cc} de liquide.....	0 gr. 285	0 gr. 268
Pouvoir rotatoire des substances en solution...	—42°,1	—46°,6

On ne peut expliquer ce résultat qu'en admettant que la trypsine n'était pas absolument détruite dans le premier flacon ;

les actions digestives des deux ferments se sont en quelque sorte additionnées. Et, en effet, l'addition de tyrosinase aux deux liquides donne, dans le second, une teinte rouge, puis verte très pure, et dans le premier une teinte rouge, puis d'un vert moins pur, mêlé de brun. La question que nous nous étions posée n'était donc pas entièrement résolue; d'autre part, il ne faut pas songer, dans cet essai, à employer, pour détruire la trypsine, une température plus élevée; car alors la papaïne se trouverait par trop affaiblie, et les résultats qu'on retirerait d'une telle méthode seraient par trop douteux.

Pour résoudre la question, j'ai cherché à tourner la difficulté: il suffisait, à cet effet, de faire varier la durée du contact des deux ferments.

Si un contact plus prolongé correspond à un amoindrissement du pouvoir digestif de l'ensemble des deux ferments, c'est que les ferments auront eu l'un sur l'autre une action nuisible; mais il faut tenir compte, dans ces essais, de l'affaiblissement qu'éprouvent les solutions des ferments par le seul fait d'être maintenues plusieurs heures à 40°. Dans ce but, quatre essais furent institués simultanément.

I. Papaïne et pancréatine ont été chauffées ensemble 11 heures à 40°.

II. Papaïne et pancréatine ont été chauffées séparément 10 h. 1/2, puis réunies et chauffées ensemble une demi-heure à 40°.

III. Papaïne, et pancréatine tuée par ébullition préalable ont été chauffées 11 heures à 40°.

IV. Pancréatine, et papaïne tuée par ébullition préalable ont été chauffées 11 heures à 40°.

Les doses étaient les suivantes: pour I, III, IV, 0 gr. 10 de chacun des ferments pour 25^{cc} d'eau chloroformée.

Le liquide II était formé par la réunion de 2 liquides contenant 0 gr. 20 de ferment pour 25^{cc} d'eau (total 0 gr. 20 de chaque ferment dans 50^{cc}). On ajoute à tous les liquides de la fibrine (10 gr. dans II, 5 gr. dans les autres) et, après 12 heures, on compare les résidus d'évaporation d'un même volume, 10^{cc}, de chaque liquide, et les pouvoirs rotatoires de ces produits:

	I	II	III	IV
Résidus d'évaporation de 10 ^{cc} ...	0 gr. 372	0 gr. 334	0 gr. 252	0 gr. 370
Pouvoirs rotatoires des substances dissoutes.....	—29°,41	—31°,43	—46°,95	—33°,79
Résidus non digérés.....	0 gr. 558	0 gr. 642(1)	0 gr. 779	0 gr. 559

On voit qu'en I, où le contact des ferments a duré 10 h. 1/2 de plus qu'en II, l'action digestive s'est montrée plus intense (plus grande quantité de substances dissoutes, plus faible pouvoir rotatoire). Elle est également plus forte qu'en IV (digestion pancréatique seule). Le premier fait peut trouver son explication dans la présence de substances étrangères accompagnant les ferments : les unes, aidées par la chaleur, tendent à affaiblir un des ferments ; les autres, accompagnant l'autre ferment, s'opposent à l'action des premières, soit en modifiant la réaction du liquide, soit en les précipitant. Quant au deuxième fait, il peut ainsi s'interpréter : presque toute l'action de la pancréatine se porte sur les produits de dissolution de la fibrine par la papaïne ; car celle-ci désagrège plus rapidement la fibrine que ne fait la pancréatine. Le pouvoir dissolvant de la papaïne favorise donc le pouvoir plus profondément protéolytique de la pancréatine. En tous cas, l'expérience montre qu'il n'y a pas affaiblissement des ferments l'un par l'autre.

III. — PEPSINE ET PAPAÏNE.

Ici une méthode générale peut être suivie. S'agit-il d'étudier l'action du ferment *a* sur le ferment *b*, on les fait digérer ensemble, puis on annihile *a* sans toucher à *b*, on ajoute de la fibrine et on fait digérer. Un autre flacon, contenant *a* tué par ébullition et *b* non tué, permet de comparer les actions digestives et de voir si réellement *a* détruit partiellement *b*. Ce procédé est facile à mettre en pratique : pour entraver l'action de la pepsine sans arrêter celle de la papaïne, il suffit de neutraliser le liquide ; pour empêcher l'action de la papaïne en donnant à la pepsine son maximum d'action, on acidule à 3 p. 1000 d'HCl le liquide fermentaire.

(1) En réalité, le résidu était deux fois plus fort. On l'a divisé par 2, pour le rendre comparable aux autres résidus de digestion, lesquels provenaient, non de 10 gr., mais de 5 gr. de fibrine.

1° *Action de la papaïne sur la pepsine en milieu neutre.* —

On prépare le mélange suivant (A) :

Pepsine.....	0 gr. 10.
Papaïne.....	0 gr. 10.
Eau distillée.....	23 gr.
Chloroforme.....	XXX gouttes.

et en même temps deux témoins, aux mêmes doses ; mais dans l'un (B), la pepsine est détruite par ébullition préalable ; dans l'autre (C), la papaïne est détruite. Après 5 heures de digestion à 40°, on ajoute à chaque liquide 2^{ce}50 d'acide chlorhydrique dilué à 1/10, ce qui détermine une teneur de 3,06/1000 en HCl, et 5 gr. de fibrine essorée. On porte à l'étuve à 40°, et on laisse digérer 12 heures. Au cours de la digestion, voici ce que l'on constate :

	A	B	C
Au bout de 10 minutes	commence à se liquéfier	en masse	complètement liquide.
— 20 —	liquéfié	en masse	liquide, plus fluide que A.
— 12 heures	liquide, trouble	en masse	liquide, trouble.

On filtre A et C : le premier filtre moins vite ; les deux liquides passent troubles, et, même après plusieurs filtrations, même après dilution à 1/6, il est impossible de les examiner au polarimètre. Mais si, aux liquides dilués, on ajoute goutte à goutte des quantités égales d'acide azotique, le trouble produit est de beaucoup plus intense en A qu'en C. La pepsine a donc été affaiblie par la papaïne.

2° *Action de la papaïne sur la pepsine en milieu faiblement acide.* — L'essai fut conduit comme le précédent : on opérait en milieu contenant 0,306/1000 de HCl, acidité qui n'entrave pas totalement l'action papaïque. Après séjour de 5 heures à 40°, on ajoutait la quantité d'acide nécessaire pour amener l'acidité à 3,06/1000. On faisait alors digérer la fibrine.

	A	B	C
Au bout de 5 minutes	commence à peine à se liquéfier	en masse	presque complètement liquéfié.
— 15 —	presque complètement liquéfié	en masse	totalement liquéfié, plus fluide que A.
— 12 heures	liquide, trouble	en masse	liquide, trouble.

Pour la filtration, la précipitation azotique, les résultats furent identiques à ceux de l'essai précédent.

3° *Action de la pepsine sur la papaïne en milieu d'acidité pepsique.* — On prépare le mélange suivant :

Papaïne.....	0 gr. 10.
Pepsine.....	0 gr. 10.
Eau distillée.....	23 gr.
Acide chlorhydrique dilué 1/10.....	2 ^{cc} 50
Chloroforme.....	XXX gouttes.

et, en même temps, un témoin avec les mêmes doses de substances, mais où la pepsine a été au préalable tuée par ébullition. Après digestion de 5 heures à 40°, on neutralise exactement par la potasse (2^{cc}1 de solution normale, quantité correspondant à l'acidité du milieu, 3,06/1000 de HCl). On ajoute 5 gr. de fibrine, et on porte à l'étuve, 12 heures, à 40°. Au bout de ce temps, la fibrine ne paraît désagrégée ni dans l'un, ni dans l'autre des flacons. Peut-être est-elle un peu moins tenace dans le flacon témoin. Les résidus non digérés pesaient respectivement 1 gr. 622, et, pour le témoin, 1 gr. 609. La destruction de la papaïne est donc, on peut le dire, due exclusivement à l'acidité du milieu.

4° *Action de la pepsine sur la papaïne en milieu faiblement acide.* — L'essai fut conduit comme le précédent, mais les solutions d'acide, et de potasse, employées précédemment, étaient diluées au 1/10. Le milieu contenait donc 0,306/1000 de HCl.

On ne put constater nettement d'affaiblissement de la papaïne par la pepsine : le flacon d'essai contenait pour 10^{cc} 0 gr. 213 d'albuminoïde de pouvoir rotatoire — 46°,9 ; pour le flacon témoin les chiffres correspondants étaient 0 gr. 224 et — 46°,8.

En résumé : 1° La pancréatine et la papaïne ne se détruisent ni totalement ni partiellement. Elles ajoutent leurs actions. 2° La pepsine n'agit pas nettement sur la papaïne ; la destruction de celle-ci, quand elle se produit, est l'œuvre de l'acide. 3° La papaïne en milieu neutre ou légèrement acide détruit partiellement la pepsine.

Au point de vue de la façon dont elle se comporte envers la pepsine, la papaïne est donc comparable à la trypsine, de même qu'elle lui est comparable, jusqu'à un certain point, pour ce qui concerne ses conditions d'action (réaction du milieu).

CHAPITRE VII

Action de l'eau de brome sur les produits de digestion des albuminoïdes.

Les réactions déterminées par la tyrosinase étant des réactions d'oxydation, il était à supposer que l'on pourrait la remplacer, dans l'étude des produits de digestion, par un réactif chimique. Malheureusement les quelques réactifs dont j'ai essayé l'action ne m'ont donné aucun résultat utilisable. C'est ainsi que la solution de gomme arabique, qui, comme on sait, oxyde un certain nombre de composés phénoliques en produisant des réactions colorées (gaïacol, crésol, naphтол α ...) s'est montrée sans action sur le chromogène verdissant des peptones pepsiques ou papaïques, non plus que sur la tyrosine. J'ai essayé en vain également le mélange acide cyanhydrique et sulfate de cuivre, qui, comme l'ont montré MM. Bourquelot et Bougault (1), oxyde le naphтол α , le gaïacol, la vératrylamine, avec production des mêmes réactions colorées que détermine la tyrosinase. L'essence de térébenthine insolée, avec laquelle, à la longue, j'ai pu obtenir un faible bleuissement du décocté alcoolique de *Boletus erythropus* frais, n'a produit ici aucune coloration sensible. Le nitrite de potasse en présence d'acide acétique fut

(1) *Soc. Biolog.*, 22 mai 1897, (10) IV, p. 498.

également sans action. Le bioxyde de plomb, à chaud, en milieu neutre ou acide, n'a déterminé qu'une faible coloration jaune-rougeâtre avec les divers produits de digestion. L'eau oxygénée s'est spontanément décomposée à leur contact, sans coloration. Le perchlorure de fer n'a donné avec les diverses digestions, sans distinction, qu'une coloration plus ou moins rouge. Il en fut de même du ferricyanure de potassium en présence d'ammoniaque, réactif oxydant indiqué récemment par Candussio pour caractériser les phénols (1).

En passant ainsi en revue les divers agents d'oxydation, je fus amené à essayer l'action de l'eau de brome, et à trouver ainsi une réaction distinctive des peptones pepsiques et pancréatiques. Quelques gouttes d'eau de brome saturée déterminent en effet dans les liquides de digestion pancréatique d'albumine, de fibrine, de caséine, de cong lutine, la formation d'un précipité jaune rougeâtre qui se redissout par agitation, avec teinte rose violacé. 5^{cc} du liquide obtenu dans l'essai de la pancréatine par la fibrine (Suppl. Codex, 1895) sont déjà nettement colorés en rose par 5 gouttes d'eau de brome. 20 à 30 gouttes donnent une couleur rouge violacée intense ; au delà de 35 gouttes, la couleur devient plus sale et le liquide se trouble ; au delà de 60 gouttes, il se forme un précipité brun violacé nageant dans un liquide jaune. Cette réaction ne se produit nettement que si on ajoute peu à peu l'eau de brome. 80 gouttes ajoutées d'un coup déterminent un précipité jaune, qui, à la longue, devient ocracé, puis brun violacé, sans passer par la teinte rouge violacé. L'addition préalable d'acide chlorhydrique dans la proportion employée pour les digestions pepsiques (3/1000 HCl) n'empêche pas la réaction, mais un excès l'entrave. Avec les digestions pepsiques, pas de coloration rouge, que le liquide soit acide, ou qu'il ait été neutralisé au préalable. Dans le premier cas, l'eau de brome ne colore même pas la liqueur en jaune, à moins qu'on n'en mette un grand excès : il se fait alors un précipité jaunâtre qui ne change pas de couleur à la longue (2). Dans le second cas,

(1) Ueber ein neues Reagenz auf Phenolverbindungen ; *Chem. Ztg.*, p. 299, 1900, d'après *Apoth. Ztg.*, XV, p. 268. 1900.

(2) Cette précipitation a été utilisée par Allen pour le dosage des peptones ; *Pharm. Journ.*, 1897, p. 561, d'après *Journ. pharm. et chim.*, (6) VII, p. 111, 1898.

l'eau de brome détermine un léger trouble avec très faible et très peu nette coloration brunâtre sale ; un excès de réactif donne un précipité jaune. La coloration rouge que l'on obtient avec les peptones pancréatiques ne saurait être attribuée à la tyrosine : quelques gouttes d'eau de brome ajoutées à une solution aqueuse de tyrosine, neutre ou légèrement acidulée par l'acide chlorhydrique, la laissent incolore ; un excès la colore en jaune, sans trouble. Avec les digestions papaiques, la coloration rose-violacé par l'eau de brome se produit également, mais beaucoup plus faible qu'avec les digestions pancréatiques.

En son temps, j'avais cru que cette réaction était nouvelle ; mais depuis, j'ai pu m'apercevoir qu'il n'en était rien. Néanmoins, comme elle est peu connue actuellement, je crois pouvoir résumer ici les travaux qui ont été publiés à son sujet, sans cependant qu'on soit arrivé à connaître exactement le chromogène, ni même le pigment rouge qui en dérive.

Tiedemann et Gmelin (1), les premiers, ont constaté la coloration en rouge du suc pancréatique du chien par addition d'eau de chlore. Cl. Bernard (2) a trouvé le chromogène dans la digestion tryptique de caséine, la macération de pancréas....., et dans les produits de putréfaction des albuminoïdes. Il le considère comme identique au corps devenant rouge par l'acide azoteux, corps reconnu depuis pour être l'indol. Kühne (3) différencie le corps en question de l'indol, celui-ci étant volatil. Il reconnaît que le chlore peut être remplacé, dans cette recherche, par le brome, mais que l'iode est sans action. Il reconnaît de plus (4) qu'il se forme par digestion tryptique en dehors de toute putréfaction, et à l'exclusion de l'indol, lequel ne se forme que dans la putréfaction, et après lui. Ce corps dériverait, selon Kühne, de l'hémigroupe et non de l'antigroupe. Laudur Brunton (5) prétend que la couleur rouge est due à la présence,

(1) Die Verdauung nach Versuchen, 2. Aufl., Heidelberg, 1831.

(2) Mémoire sur le pancréas, *C. R. Ac. Sc.* ; Suppl. I, (1856) p. 403 à 409.

(3) *Ber. d. Deutsch. chem. Gesell.*, VIII, 1875.

(4) Kühne et Chittenden; *Ztschr. f. Biol.*, XIX et XX.

(5) Burdon Sanderson, *Handbook for the physiological Laboratory*, trad. Moquin-Tandon, Paris 1884, p. 525.

dans le liquide, de naphtylamine, mais Hémala (1) nie cette identité.

Krukenberg (2) constate que le chromogène en question est dialysable, qu'il est insoluble dans l'éther et le chloroforme, qu'il n'est pas distillable, et se détruit rapidement à 100°. Il est précipité par le sublimé et par l'azotate d'argent, mais ne l'est pas par le ferrocyanure acétique, ni par l'acide phosphotungstique. La matière colorante rouge est, par contre, soluble dans l'éther, le chloroforme; et ses solutions montrent une bande d'absorption nette vers la raie D. Les halogènes (Cl. Br.) en font partie intégrante, et on peut les enlever par agitation avec l'azotate d'argent. Le filtrat incolore redevient rouge par nouvelle addition d'eau de brome. D'après Krukenberg, ce corps ne serait pas un albuminoïde, mais appartiendrait au groupe de l'indigo.

R. Neumeister (3) constate que le chromogène, qu'il nomme *tryptophane*, se produit dans tous les processus entraînant la destruction profonde des albuminoïdes, digestion trypsique, putréfaction, action des acides ou des alcalis à chaud; il accompagne toujours la tyrosine, et, de sa présence, on peut conclure à celle de la tyrosine. Soluble dans l'alcool amylique, stable à 100°, il n'est pas entraînable par la vapeur d'eau. La matière rouge est à peu près insoluble dans l'eau et les acides dilués. Elle résiste à l'acide sulfurique à 5 %, mais la présence de cette proportion d'acide empêche sa production par addition d'eau de chlore; l'acide acétique est sans influence. Ce corps rouge est soluble dans les alcools amylique et éthylique, moins dans l'éther et le chloroforme. Desséché à 100°, repris par l'alcool, et laissé en contact avec ce dissolvant, il devient soluble dans l'eau.

Les recherches en étaient là quand Stadelmann (4), à qui j'emprunte en grande partie cette bibliographie, reprit la

(1) *Chem. Untersuch. zur wissenschaft. Medicin von Krukenberg*. 2. Heft.

(2) *Verhandl. d. Würzburg. Ges.*, XVIII, 1884, et *Virchow's Archiv*. Bd. CI, 1885.

(3) Ueber die Reactionen der Albumosen und Peptone; *Ztschr. f. Biol.*, XXVI, p. 324, 1889.

(4) Ueber das beim tiefen Zerfall der Eiweisskörper entstehende Proteinochromogen, *Ztschr. f. Biol.*, XXVI, p. 491, 1889.

question. Pour éviter toute confusion, il désigne sous le nom de *protéinochromogène* la substance devenant rouge par le brome, et sous le nom de *protéinochrome* la matière colorante formée. Ses recherches ont porté sur les produits de digestion de la fibrine par la trypsine. Le liquide étant débarrassé des albuminoïdes coagulables, et concentré, il en séparait la leucine et la tyrosine cristallisées, et il y ajoutait peu à peu de l'eau de brome jusqu'à formation d'un précipité rouge violet, nageant dans une liqueur jaunâtre. La réaction se produit, quoiqu'en ait dit Hémala, en milieu neutre, et, un peu plus lentement, en milieu alcalin.

Stadelmann fit sur le protéinochromogène quelques recherches qui confirmèrent en partie ce que ses prédécesseurs avaient trouvé : destruction par les acides minéraux et les alcalis à l'ébullition, insensibilité à l'acide acétique ; solubilité dans l'acide acétique, plus faible dans l'éther acétique et l'alcool amylique, nulle dans l'éther et le chloroforme. Le résidu d'évaporation de sa solution amylique est soluble dans l'eau, non précipitable par le ferrocyanure acétique, et ne donne pas la réaction du biuret. Il est précipité par le sublimé, les azotates de mercure, le tannin, l'acide phosphotungstique, mais non par le sulfate d'ammoniaque à saturation. Il ne distille pas, n'est pas détruit à 100° ; il est dialysable. Il se conserve sans altération, sauf par putréfaction avancée. Stadelmann ne put aller plus loin dans cette étude, et s'adressa au protéinochrome qu'il purifia ainsi : le précipité brut, lavé à l'eau, est soumis à l'ébullition dans l'alcool à 90° à plusieurs reprises, tant que l'alcool se colore en violet. Il reste un résidu brun insoluble (E). Les liquides alcooliques sont distillés, et le résidu est précipité par addition d'eau ; la précipitation est totale, quoiqu'en ait dit Neumeister ; le produit, lavé à l'eau, est desséché et épuisé par l'éther, qui en dissout une partie (B). La partie non dissoute par l'éther (A) est reprise par l'alcool qui n'en dissout qu'une partie (C) avec couleur violet sombre, tandis que l'autre partie (D), difficilement soluble, reste indissoute. Le corps A, formant la majeure partie du protéinochrome brut, est insoluble dans l'éther, l'éther de pétrole, les acides sulfurique, acétique, azotique, à froid ; il est détruit à froid par la lessive de soude

et le réactif de Millon, à chaud par les acides minéraux. Il se dissout à chaud dans l'acide acétique avec destruction partielle. L'oxyde d'argent le décolore à chaud, et le filtrat ne se colore plus par addition de brome.

Les protéinochromes se dissolvent dans l'acide sulfurique à chaud avec couleur brune, et diffèrent par là du pigment rouge dérivé de la naphtylamine par oxydation, lequel se dissout avec couleur bleu verdâtre passant au violet sale. D'autre part, le brome colore la naphtylamine en vert bleu sombre. Ces réactions différencient le protéinochromogène de la naphtylamine.

Examinée au spectroscope, la solution éthérée de B présente une large bande dans le vert, mal limitée vers le bleu. A, en solution alcoolique, ne présente qu'un assombrissement dans le vert ; la bande paraît nette par alcalinisation, ou par action de l'amalgame de sodium. C et D, en solution alcoolique, absorbent toute la partie droite du spectre ; en solution alcaline, ils présentent une bande faible dans le vert. Mais ces spectres d'absorption n'ont rien de constant et semblent d'autant plus nets que le produit est plus impur. Stadelmann est porté à attribuer la bande d'absorption à une impureté soluble dans l'éther de pétrole, peut-être un produit de destruction du protéinochrome par les alcalis.

La composition des corps ne présente pas plus de constance. Tous contiennent de l'azote, du soufre, du brome ; la proportion de Br y varie de 19 à 35 %, les composés les plus bromés étant plus rouges, les moins bromés étant plus bruns. La teneur en soufre, plus forte que celle des albuminoïdes (fibrine 1,1 % ; albumoses 0,85-1,2 %, fibrine-peptone 0,7 %) s'expliquerait de ce fait que le protéinochromogène dérive de l'hémi-peptone, et que les autres dérivés de l'hémi-peptone, tels que tyrosine, leucine, acide aspartique, sont dépourvus de soufre. Stadelmann, considère le protéinochromogène comme un albuminoïde particulier, caractérisé par sa forte teneur en soufre.

En 1895, Nencki, cité par Halliburton (1) comme ayant établi

(1) Lehrbuch der chemischen Physiologie und Pathologie, trad. allem. Kaiser, p. 684.

l'identité du protéinochromogène avec la naphtylamine, proteste contre cette assertion, et nie s'être jamais occupé de ce corps. En réalité, Nencki avait étudié la formation de l'indol par putréfaction et reconnu que, comme la naphtylamine, il était volatil, ces deux corps donnant d'ailleurs, par action de l'acide azotique, naissance à des matières colorantes rouges douées de propriétés différentes (1). « Ayant été de façon si peu courtoise mis en relation avec le protéinochromogène, et accusé d'avoir commis l'erreur grossière de considérer comme entraînable par la vapeur d'eau un dérivé complexe de l'albumine », Nencki voulut faire plus ample connaissance avec ce corps (2).

Il employa comme matière première pour cette étude les produits d'autodigestion du pancréas en présence de chloroforme. Le liquide obtenu fut précipité par le sublimé, qui, contrairement à ce qu'avait avancé Stadelmann, ne précipite pas le protéinochromogène, mais précipite les bases xanthiques. (xanthine, hypoxanthine, guanine, adénine...) Le filtrat, débarrassé du mercure par l'hydrogène sulfuré, est concentré, puis séparé par filtration de la leucine et de la tyrosine cristallisées. Dans le liquide, Nencki ajoute peu à peu de l'eau de brome, en s'arrêtant avant la formation du précipité brun. Le précipité violet qu'il obtient, et qu'il considère comme un mélange de divers composés impossibles à isoler, est lavé à l'eau, desséché, et repris par l'alcool à 80° chaud. La solution filtrée se précipite par refroidissement. Un deuxième épuisement alcoolique du précipité brut abandonne de même une seconde fraction différente de la première, car elle contient p. 100, 19,19 de Br et 1,20 de S, au lieu de 15,67 de Br, et 0,92 de S que contient la première. D'autre part, le précipité brut, lavé simplement à l'eau chaude, contenait p. 100, 27 de Br, et 0,51 de S.

Ce produit est soluble en rouge dans les alcalis fixes dilués, mais s'altère dans ces solutions, en devenant brun. Il est difficilement soluble dans l'ammoniaque. Les réducteurs décolorent ses solutions avec précipitation de flocons bruns contenant du

(1) *Ber. d. Deutsch. Ch. Gesell.*, VII, p. 1593.

(2) *Zur Kenntniss der pankreatischen Verdauungsprodukte des Eiweisses*; *Ber. d. Deutsch. Ch. Gesell.*, XXVIII, p. 560, 1895.

brome. En traitant par un réducteur (zinc et acide acétique) la partie insoluble dans l'alcool, on obtient un corps brun contenant 20,5 % de brome, et 2,2 % de soufre.

D'après Nencki il se formerait, par l'action de l'eau de brome, au moins deux corps : l'un, rouge, plus riche en brome 27 %, et plus pauvre en soufre 0,5 % (peut-être même sans S à l'état pur), l'autre, brun, moins riche en brome, contenant plus de soufre. En solution alcoolique faiblement acide ou alcaline, le corps rouge montre au spectroscope la bande d'absorption signalée par Krukenberg. S'il est souillé par le corps brun, il y a assombrissement de tout le spectre, sauf du rouge. Nencki, comparant aux pigments animaux (hématoporphyrine, mélanine...) le protéinochrome, dont il calcule la composition d'après celle des protéinochromes, voit une analogie de composition entre ces corps, et émet l'hypothèse que le protéinochrome produit par digestion pancréatique pourrait bien être la substance mère des divers pigments animaux. Traité par la potasse fondante, le protéinochrome donne comme eux du pyrrol, de l'indol et du scatol.

L'étude du protéinochrome fut reprise par Beitler (1). Beitler constate que le protéinochrome n'est pas précipité par le tannin, le sublimé, le ferrocyanure acétique, l'iodure double de mercure et de potassium, l'acide picrique... Mais il est détruit par les azotates mercurieux et mercurique. Beitler, en suivant deux méthodes, arrive à obtenir un protéinochrome de composition constante. L'une de ces méthodes repose simplement sur la dialyse du produit de digestion de la fibrine par du pancréas frais. Au liquide dialysé, il ajoute de l'eau de chlore jusqu'à précipitation, recueille le précipité violet-rouge, et le lave complètement à l'eau, puis à l'éther. Dans la seconde méthode, il précipite directement le protéinochrome dans le liquide de digestion débarrassé des albuminoïdes coagulables, et le lave à l'eau et à l'éther.

Le protéinochrome obtenu est insoluble dans l'eau, très peu soluble dans l'alcool froid et l'éther acétique, insoluble dans le

(1) Ueber das Chlorproteinochrom ; *Ber. d. Deutsch. chem. Gesell.*, XXXI, p. 1604, 1898.

chloroforme. Les solutions alcooliques, rouges avec une pointe de violet, sont douées d'une fluorescence verdâtre, plus intense par long repos. Elles présentent en solution neutre ou alcaline, une large bande dans le vert, devenant plus étroite par addition d'acide chlorhydrique, se dédoublant par addition d'éther. Il est soluble dans les alcalis, mais rapidement la couleur rouge-violacé passe au brun. Par contre, il est stable en solution acide, même à chaud. Le protéinochromogène lui-même résisterait à l'action des acides à chaud. Beitler attribue au protéinochrome, en admettant que ce soit un corps unique, la formule $C^{96} H^{116} Cl^3 Az^3 O^{31} S$; il dériverait du protéinochromogène par substitution trichlorée. Il contient p. 100 1,19 S, et 4,74 Cl. Les essais de cristallisation dans l'alcool ou l'éther acétique échouèrent; l'ébullition dans ces liquides le détruit avec formation d'une couleur brune, insoluble dans l'alcool. L'oxyde d'argent décolore la solution alcoolique, en fixant le chlore. En éliminant, à l'état de sulfure, l'argent en excès, en concentrant le liquide et en reprenant par l'alcool, on obtient finalement une masse cristalline de réaction alcaline, donnant des sels cristallisés avec l'acide chlorhydrique et le chlorure de platine. Les cristaux contenaient du S et de l'Az; mais, par suite de leur faible quantité, Beitler ne put déterminer leur nature.

Pendant que Beitler poursuivait ces recherches, Kurajeff, sur l'instigation de Hofmeister, reprenait l'étude des composés bromés (1). Il s'adresse, comme Nencki, aux produits d'autodigestion du pancréas, et il en sépare les albumoses par saturation avec le sulfate d'ammoniaque, évitant ainsi la présence, dans le précipité, d'impuretés dues à l'entraînement d'albumoses. Après concentration et séparation de la leucine et de la tyrosine cristallisées, il ajoute de l'eau de brome jusqu'à précipité violet. Celui-ci est lavé complètement à l'eau, pour éliminer les peptones, puis épuisé par l'alcool à 80°; les liquides alcooliques sont évaporés à 40°. Le résidu d'évaporation est lavé à l'alcool à 20° tant que celui-ci se colore en brun, et jusqu'à ce qu'il passe

(1) Zur Kenntniss der Bromproteinochrome; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXVI, p. 501, 1898.

violet. Alors la partie non dissoute est reprise par l'alcool à 95° qui dissout un composé rouge nuancé de violet (*corps rouge* N° 1). Par deuxième et troisième épuisement à l'alcool à 95°, Kurajeff dissout un corps violet (*corps violet-bleu* N° 1). Dans le liquide filtré après addition d'eau de brome, ce réactif donne de nouveau un précipité, brun, qui, purifié par dissolution dans l'ammoniaque très diluée, et précipitation acétique, lavé ensuite à l'eau et à l'alcool, qui en dissolvent d'assez fortes proportions, constitue le *corps noir*.

Dans un deuxième essai, le protéinochrome brut est lavé à l'eau, épuisé trois fois par l'ammoniaque très diluée, et précipité de ces solutions par l'acide acétique. Le corps obtenu est soumis à une nouvelle précipitation acétique en solution ammoniacale ; puis on le reprend par l'alcool méthylique. La solution, évaporée à 40°, abandonne un *corps rouge* N° 2. Un quatrième et cinquième traitement ammoniacal du protéinochrome brut, suivi de précipitation acétique, donne un corps qui, repris par l'alcool à 95°, forme après évaporation de son dissolvant, à 40°, le *corps violet-bleu* N° 2.

Ces divers corps sont solubles dans les alcalis dilués, et précipités par acidification, sans changement apparent. Ils sont insolubles dans l'éther de pétrole, solubles dans l'acide acétique cristallisable ; ils résistent à l'action à 100° des acides chlorhydrique et acétique dilués. En solution alcaline, ils sont précipités par l'azotate d'argent avec décoloration de la solution. Le précipité, traité par l'acide acétique, régénère le corps bromé. Le corps rouge est peu soluble dans l'eau, l'éther, le chloroforme, soluble dans les alcools éthylique, méthylique, amylique. Le corps noir est plus soluble dans l'eau, moins dans l'alcool ; il est insoluble dans l'éther, le chloroforme, l'alcool amylique. La composition des protéinochromes est variable, le corps rouge renfermant p. 100 25-27 de Br, le corps noir 27, le corps violet 32-34. La plus forte proportion de S qui s'y trouve n'est que de 1,27 p. 100. D'où Kurajeff conclut que les composés analysés par Stadelmann, et contenant 2 à 3 % de S, étaient souillés d'albuminoïdes. Kurajeff admet qu'il se forme par le brome au moins trois corps : un violet avec nuance d'autant plus bleue qu'il est plus pur, un rouge et un brun. Celui-ci,

insoluble dans l'éther, soluble dans l'alcool, différerait du corps rouge par CH^3 en moins, et OH en plus. Les deux premiers corps se précipiteraient simultanément par l'eau de brome ; le troisième serait un dérivé bromé du protéinochromogène oxydé par le brome. Tous les trois, donnant par la potasse fondante de l'indol et du scatol, seraient des dérivés de l'indol.

Quant à l'origine du protéinochromogène, Kurajeff l'a recherchée en soumettant à la digestion trypsique les diverses fractions d'albumoses isolées par le sulfate d'ammoniaque. Il obtint le chromogène dans la digestion des albumoses primaires (ensemble) et aussi dans celle de l'albumose secondaire A. Par contre l'albumose secondaire B n'en donne pas. Il se formerait donc, dans la digestion trypsique, au stade de formation des albumoses, et avant la deutéroalbumose B.

Depuis, Pick (1) a remarqué que, parmi les albumoses primaires, la protoalbumose seule donne naissance, par digestion trypsique, au protéinochromogène ; elle fournit aussi de la tyrosine et de la leucine. L'hétéroalbumose, qui, dans les mêmes conditions, ne donne pas de tyrosine, mais du glycocolle et de la leucine, est incapable, comme la gélatine, de former le protéinochromogène.

Telles sont les données que l'on a actuellement sur le *Bromkörper*, *tryptophane* ou *protéinochromogène*. Il était intéressant de les réunir ici et de mettre en relief la réaction de l'eau de brome, qui peut être utilisée dans la différenciation des peptones médicinales, pancréatiques ou pepsiques. En effet, avec les produits pepsiques, la coloration par le brome, quand elle ne fait pas défaut, est à peine perceptible, comme j'ai d'ailleurs pu le constater par addition ménagée de vapeur de brome au liquide obtenu en soumettant, près de 6 mois, à la digestion pepsique, de la fibrine desséchée à 40° et pulvérisée.

(1) Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXVIII, p. 219, 1899.

CHAPITRE VIII

Remarques sur l'autodigestion de la fibrine en milieu antiseptique.

J'ai eu souvent l'occasion, au cours de ce travail, d'employer de la fibrine fraîche. Celle-ci était obtenue par battage du sang, puis lavée et pétrie sous un courant d'eau jusqu'à blancheur parfaite, et finalement conservée par immersion dans l'eau distillée additionnée d'un excès de chloroforme, dans un flacon plein et bien bouché. Dans ces conditions, la fibrine ne peut subir aucune putréfaction, et peut être ainsi mise en réserve pour les essais ultérieurs. Mais la conservation de la fibrine n'est pas illimitée. En effet, au bout d'un temps variable, le plus souvent au bout d'un mois environ, la fibrine laissée en repos commence à se tasser, devient moins tenace, à tel point qu'on n'éprouve aucune résistance à rompre par traction les filaments qui la constituent ; puis, en quelques jours, le tassement s'accroît, et peu à peu toute la fibrine se trouve transformée en une masse pultacée. Le liquide qui la recouvre mousse par agitation ; se coagule par la chaleur, par l'acide azotique à froid ; le sulfate de magnésie à saturation y produit un trouble abondant. Par la suite le liquide prend peu à peu une couleur jaunâtre, à mesure qu'augmente la proportion des albuminoïdes en solution. Si l'on emploie, pour conserver la fibrine, de la glycérine pure,

la conservation est prolongée, mais au bout d'un certain temps, la fibrine éprouve un ramollissement et une désagrégation analogues.

Déjà à plusieurs reprises, une semblable dissolution de la fibrine en présence de divers sels a été signalée par Denis de Commercy (1838-1856), Liebig et Scherer (1843), Plósz (1872), A. Gautier (1874), Kistiakowski (1874), Herrmann (1887), Limburg (1889), Arthus (1891). M. Dastre, qui cite les auteurs précédents, attribue aux sels eux-mêmes une action digestive, et crée le terme de *digestion saline*. Il combat l'hypothèse de la présence de pepsine, fixée sur la fibrine, en montrant que les acides empêchent toute autodigestion de la fibrine ; il élimine l'hypothèse de la présence de trypsine en disant qu'il ne se forme pas de tyrosine par digestion saline (1).

Herrmann a obtenu une autodigestion analogue en présence de thymol (2) ; il admet qu'elle est le fait d'une putréfaction, et montre que cette autodigestion est analogue à la digestion tryptique. E. Salkowski a observé l'autodigestion en présence de chloroforme (3) ; il explique ce fait par l'action, en présence du chloroforme, d'un ferment protéolytique produit, avant l'immersion dans l'eau chloroformée, par des bactéries de la putréfaction. Denys et de Marbaix (4) admettent une action digestive du chloroforme, allant jusqu'à la formation de leucine et de tyrosine. D'après eux, un grand nombre d'autres corps définis auraient une action analogue (éther, alcool, thymol, acide phénique.....). E. Salkowski, reprenant l'étude de l'autodi-

(1) *C. r. Soc. biol.*, (10), I, p. 375, 377, 778, 779, 781 ; 1894.

(2) Ueber die Verdauung des Fibrins durch Trypsin. *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XI, p. 523, 1887.

(3) *Ztschr. f. Biol.*, (N. F.), VII, p. 92, 1889.

(4) Sur les peptonisations provoquées par le chloroforme et quelques autres substances ; *La Cellule*, V, p. 197 ; 1889.

— Nouvelles recherches sur la digestion chloroformique ; *Ibid.*, VI, p. 1, 1890.

— Recherches sur l'existence de la trypsine dans différents viscères ; *Ibid.*, VI, p. 52, 1890.

gestion de la fibrine en présence de chloroforme, constata (1) que le liquide obtenu, soit au bout de 6 semaines, soit au bout de 5 ans et demi, ou même après 11 ans, n'avait aucune odeur de putréfaction, ni ne donnait de colonies sur gélatine nutritive. Il admet l'action d'un ferment ; il n'admet pas que la minime quantité de ferment que pourraient avoir produit, malgré les soins du lavage de la fibrine, quelques rares bactéries de la putréfaction, ait pu exercer par la suite, en présence de chloroforme une action digestive aussi intense : le ferment agit comme la trypsine, avec produit de leucine et de tyrosine. Ayant signalé précédemment la présence de trypsine dans divers tissus (foie, tissu musculaire...) qui subissent en présence d'eau chloroformée, sans putréfaction, une autodigestion avec production de leucine et de tyrosine, Salkowski pense qu'il en existe également dans le sang : au moment de sa séparation, la fibrine fixerait ce ferment, qui déterminerait par la suite l'autodigestion.

M. Dastre, opérant en solutions salines à dose antiseptique (chlorure de sodium à 15 p. 100, fluorure de sodium à 2 p. 100, chlorhydrate d'ammoniaque à 10 p. 100...) n'a constaté la formation, par autodigestion de la fibrine, que de globulines, protéoses et peptones ; mais il n'a pas obtenu de tyrosine. Il est probable que les recherches étaient entreprises après une autodigestion trop peu prolongée, et que la quantité de tyrosine était trop faible pour être décelée. Les quelques recherches que j'ai faites tendent à démontrer que l'autodigestion en présence de chloroforme (digestion chloroformique) est en réalité une digestion trypsique, et quoique je n'aie pas étudié la digestion saline, l'hypothèse d'une action trypsique semble cadrer presque absolument avec les circonstances des digestions salines.

1° *Il se forme de la tyrosine par autodigestion, même peu intense, de la fibrine.* Pour le démontrer, j'ai eu recours aux deux réactifs employés précédemment : la tyrosinase donne avec ce liquide une coloration rouge plus ou moins foncée, puis

(1) Ueber eine langsam verlaufende Eiweisspaltung ; *Ztschr. f. physiol. Chem.*, XXVII, p. 305, 1899.

brune, ou noire si l'autodigestion est plus avancée. L'eau de brome, ou mieux la vapeur de brome, ajoutée à ces liquides, produit la coloration rouge-violacé, due au protéinochromogène dont la formation accompagne toujours celle de la tyrosine. Dans des essais de durée plus prolongée, que j'exposerai plus loin, la tyrosine a pu être obtenue en nature.

2° *L'autodigestion est le fait d'un ferment protéolytique, fixé sur la fibrine.* En effet, la fibrine se conserve d'autant mieux qu'elle a été lavée plus longtemps. De la fibrine, lavée simplement jusqu'à blancheur s'est complètement désagrégée en 8 jours environ, en présence d'eau distillée et d'un excès de chloroforme. La même fibrine, lavée plus longtemps, a commencé à se ramollir au bout d'un mois. Enfin, dans un cas, où j'avais soumis la fibrine, lavée jusqu'à blancheur parfaite, à quatre expressions successives et quatre macérations successives, d'une heure chacune, dans l'eau chloroformée, elle put se conserver 3 mois sans perdre de sa ténacité. Le 5^e mois, elle était devenue moins ferme ; à la fin du 6^e mois, elle était désagrégée (il n'est pas possible, en effet, d'enlever complètement par lavage l'enzyme fixée sur la fibrine). De la fibrine bouillie se conserve d'autre part dans l'eau chloroformée sans perdre de sa ténacité, même après plus d'un an.

3° *Le ferment fixé sur la fibrine agit comme la trypsine.* Je vais rapporter d'abord une expérience de M. Dastre sur la digestion saline, et, la comparant à un essai que j'ai fait en présence de chloroforme, interpréter différemment ses résultats. M. Dastre met dans un bocal contenant une solution de fluorure d'ammonium à 3/100, deux nouets d'étamine, contenant, l'un, de la fibrine fraîche, obtenue antiseptiquement ; l'autre, la même quantité de fibrine bouillie. Il porte le tout à 40° pendant plusieurs jours. La fibrine fraîche disparaît presque complètement, la fibrine cuite ne varie pas. Il en tire cette conclusion que la digestion n'est due ni à des microbes ni à un ferment : « Les ferments solubles protéohydrolytiques, non plus que les microbes, ne sont empêchés d'agir par l'état préalable de coction de la matière : ils détruisent aussi complètement, quoique plus lentement les albuminoïdes cuits que les albuminoïdes crus. Il

faut donc que ce ne soit pas eux qui aient digéré la fibrine crue de l'expérience précédente (1) ». J'ai répété cette expérience, non en solution saline, mais en présence de chloroforme, et en faisant intervenir la trypsine. 5 grammes de fibrine exprimée sont maintenus 10 minutes dans l'eau bouillante. 5 gr. de la même fibrine exprimée sont plongés pendant 30 minutes dans 125 cc de solution filtrée de pancréatine à 0,50/1000, puis lavés deux fois, en exprimant après chaque lavage. La fibrine ainsi impressionnée et la fibrine cuite sont enfermées chacune dans un nouet de toile bouillie au préalable, et les deux nouets sont placés dans un bocal contenant 500 gr. d'eau, et un grand excès de chloroforme. Le bocal est soigneusement bouché, puis mis à l'étuve à 40°. Ayant constaté, dans un essai témoin préparé dans les mêmes conditions, en mettant, dans ce cas, directement la fibrine dans le liquide, que l'attaque de la fibrine commençait déjà à la fin du premier jour, et était presque complète au bout du 3^e jour, j'attendis 6 jours avant d'ouvrir le bocal. A ce moment, le liquide donnait des réactions nettes avec l'eau de brome et la tyrosinase. Il contenait donc en dissolution les produits de digestion, et, sans aucun doute aussi, le ferment de la fibrine crue. Celle-ci, dans son nouet, était transformée en une petite quantité d'un résidu, qui recueilli sur un filtre, lavé, desséché, pesait 0 gr. 269. La fibrine cuite était intacte, et pesait, après lavage et dessiccation, 1 gr. 833, ce qui correspond à la teneur en matière sèche des 5 gr. de fibrine (environ 30 %). Dans un autre essai où la fibrine avait été impressionnée par contact de 45 minutes avec la même solution de pancréatine, les résultats, après 15 jours de digestion en présence de 750 gr. d'eau distillée et d'un excès de chloroforme, furent absolument comparables à ceux obtenus ci-dessus.

Résidu de la fibrine cuite.....	1 gr. 820
— crue	0 gr. 162

De l'expérience de M. Dastre, il serait donc bien difficile de conclure à l'absence d'un ferment. La non-attaque de la fibrine cuite par une solution très faible de trypsine n'a d'ailleurs rien

(1) *C. r. Soc. biol.*, (10), I, p. 782, 1894.

qui doit surprendre. J'ai fait à cet égard deux observations dont voici les résultats :

A.— *Digestion trypsique de fibrine crue et cuite dans 5^{cc} de solution à 2/500 de pancréatine ; 20 heures de digestion à 40°.*

	Résidu de digestion	Aspect du résidu	Evaporation de 5 cc du liquide
Fibrine crue (5 gr.).....	0 gr. 276	précipité grisâtre	0 gr. 192
Fibrine cuite (cuisson de 5 gr. de fibrine crue) (1).....	1 gr. 464	fibrine intacte	0 gr. 075

B.— *Digestion dans une solution de pancréatine à 0,10/1000 (11 jours à 40°).*

	Résidu non digéré	Aspect du résidu.	Evaporation de 10 cc du liquide.
Fibrine crue (5 gr.)... .	0 gr. 549	précipité ; quelques grumeaux.	0 gr. 298
Fibrine cuite (cuisson de 5 gr. de fibrine crue)..	1 gr. 764	fibrine intacte.	0 gr. 061

J'ai pu constater, au cours d'un essai d'autodigestion de la fibrine, dans les circonstances mêmes de la digestion, une analogie avec une digestion trypsique peu intense. Dans un flacon A, fermé ensuite parfaitement, on avait mis les substances suivantes :

Fibrine fraîche.....	15 gr.
Eau distillée.....	25 gr.
Chloroforme.....	15 gr.

Dans un autre flacon, B, on avait placé les mêmes substances, après avoir fait bouillir au préalable les 15 gr. de fibrine. Au bout d'un mois, la fibrine était tassée en A, mais non désagrégée. Dans le 2^e mois, sur les filaments de fibrine non encore désagrégée, paraissent des points blancs qui se sont accrus par la suite. Les flacons ayant été abandonnés pendant 10 mois environ, la fibrine s'est trouvée, au bout de ce temps, complètement désagrégée, formant une masse pultacée où l'on apercevait les petites sphères blanches observées précédemment. C'était de la tyrosine, comme on a pu s'en convaincre en en recueillant quel-

(1) La fibrine cuite retenait, après essorage, moins d'eau que la fibrine fraîche, pesait alors moins de 5 gr. On a complété les 5 gr. par addition d'eau distillée.

ques-unes, en vérifiant leur solubilité dans l'eau bouillante, l'ammoniaque, les acides, en effectuant les réactions de Millon et de Piria, et en examinant le produit au microscope après recristallisation dans l'eau ou l'ammoniaque. Dans le flacon B, la fibrine cuite était intacte.

Dans un autre flacon, C, avaient été mis, pour une autre expérience :

Fibrine fraîche.....	40 gr.
Eau distillée.....	25 gr.
Chloroforme.....	40 gr.
Pancréatine.....	0 gr. 005

Un flacon D contenait les mêmes substances, mais la fibrine avait été bouillie au préalable. Au bout de 13 jours, la fibrine est désagrégée totalement en C. En D, elle n'a pas changé d'aspect. Mais, au bout de 2 mois, on remarque en C, de petites sphères blanches (tyrosine) au milieu de la masse pultacée provenant de la fibrine. En D, la fibrine n'est pas déformée ; elle est tassée, et à la surface des filaments paraissent fixées, mais plus grosses, les mêmes sphères blanches que dans l'essai A. Quelques-unes, séparées, donnent les réactions de la tyrosine.

Jusqu'à un certain point, la comparaison peut-être soutenue au point de vue des conditions de la digestion, entre l'essai D et l'essai A, si l'on considère que la plus forte proportion de ferment en D est en partie compensée par la plus grande difficulté de digestion de la fibrine cuite ; c'est pourquoi dans les deux cas, on a pu constater la formation de sphérocristaux de tyrosine sur les filaments de fibrine, avant leur désagrégation.

En somme, par autodigestion de la fibrine en présence de chloroforme, il se forme de la tyrosine, — décelable, si la digestion est peu avancée, par la réaction spécifique de la tyrosinase, et par la réaction concomitante de l'eau de brome (tryptophane) ; — isolable en nature dans les digestions plus avancées. L'autodigestion suit la même marche que la digestion trypsique. Un lavage prolongé de la fibrine la retarde. L'action de la chaleur (100°) sur la fibrine l'empêche totalement. D'où il semble bien qu'on puisse conclure, en l'absence de bactéries, qui ne peuvent

intervenir en présence du chloroforme, à la présence d'un ferment soluble (trypsine) fixé sur la fibrine.

Cette conclusion s'accorde avec certaines données des auteurs cités précédemment. Pour Denys et de Marbaix, la digestion chloroformique rappelle exactement la digestion par la trypsine : formation de globulines, peptones, tyrosine, leucine; nécessité d'une réaction neutre; empêchement par 1,5/1000 d'acide chlorhydrique (HCl). Pour M. Dastre, l'autodigestion en présence de sels n'est pas due à la pepsine (pas d'autodigestion en milieu acide, HCl 3/1000). Mentionnons cependant comme semblant contraire à l'hypothèse d'une action tryptique, dans l'autodigestion saline, la teneur en sels des solutions, teneur qui entrave les digestions tryptiques normales; (peut-être; après tout, ne se produit-il qu'un simple retard dans la digestion) (1). Contre la même hypothèse s'élèvent, pour l'autodigestion en présence de chloroforme, l'empêchement, signalé par Denys et de Marbaix, par le carbonate de soude à 1 0/0, et l'absence, signalée par les mêmes auteurs, d'autodigestion, en présence de chloroforme, du sang recueilli aseptiquement.

Cette dernière objection est facilement réfutable, si l'on admet, avec MM. Gley et Camus (2) la présence, dans le sérum sanguin, d'une substance s'opposant à la digestion tryptique. Récemment, MM. Charrin et Levaditi (3) ont fait la même observation, et constaté que l'action inhibitrice disparaît par chauffage du sérum à 60°. Une observation que j'ai faite tend à prouver que des traces de sérum exercent une action défavorable sur l'autodigestion de la fibrine. Dans deux flacons contenant 25 gr. d'eau distillée et 10 gr. de chloroforme, on met (A) de la fibrine non

(1) En réalité, l'action tryptique n'est pas empêchée dans ces conditions. 10 gr. de fibrine impressionnée par séjour de 5 minutes dans 100^{cc} de solution de pancréatine à 8/1000, puis lavée 2 fois, plongés dans 100^{cc} de solution de fluorure de sodium à 2 %, ont été complètement dissous en 10 heures environ à la température ordinaire. 10 gr. de fibrine cuite, traités de même, après contact de 10 minutes avec la solution de ferment, étaient en grande partie dissous en 3 jours. Par contre, de la fibrine fraîche, non impressionnée, était simplement ramollie dans le même temps.

(2) *C. r. Soc. biol.*, (10), IV, p. 825, 1897.

(3) *C. r. Soc. biol.*, (10), VII, p. 86, 1900.

complètement lavée (15 gr.), encore légèrement colorée en rose, et d'autre part (B) 15 gr. de la même fibrine, mieux lavée, parfaitement blanche. La fibrine avait été exprimée chaque fois aussi fort que possible, autant que possible au même degré d'expression. Au bout de 8 jours, elle était désagrégée dans les deux flacons, mais en A elle occupait un volume un peu plus grand qu'en B. Les résidus de digestion pesaient, secs, (A) 1 gr. 121, (B) 0 gr. 987. Ce fait permet encore de conclure que la digestion n'est pas le fait d'un ferment d'origine bactérienne fixé sur la fibrine avant le lavage; dans ce cas, en effet, la fibrine moins lavée aurait dû subir une digestion plus avancée que l'autre.

Résumons-nous. Les faits peuvent ainsi s'expliquer : il y aurait passage, dans le sang, de traces de trypsine élaborée par le pancréas et déversée dans l'intestin. Pendant la coagulation du sang, cette trypsine se fixerait sur la fibrine; et en milieu neutre, la fibrine pourrait être digérée à la longue par la faible quantité de trypsine qu'elle emporte avec elle. D'autre part, les albuminoïdes du sang circulant seraient protégés contre l'action tryptique par une substance encore peu connue, un antiferment (antitrypsine).



CONCLUSIONS

Les différents faits que je viens d'exposer, qui, d'ailleurs, ont été en partie publiés, résumés, à mesure que je les étudiais (1), font du réactif *Russula*, appliqué déjà par M. Bourquelot (2) à l'essai d'identité de quelques médicaments, un réactif différentiel des peptones médicinales pepsiques et pancréatiques.

Une peptone médicinale pepsique, après dissolution et neutralisation (—par addition d'acide acétique en léger excès, puis de carbonate de chaux, si elle est alcaline ; — par le carbonate de

(1) Caractères différentiels des produits de la digestion pepsique et de la digestion pancréatique de la fibrine ; *C. r. Soc. biol.*, (10), VI, p. 70, 1899 ; et *Journ. pharm. et chim.*, (6), IX, p. 225, 1899.

Sur quelques observations relatives aux digestions pepsique et pancréatique de l'albumine ; *Journ. pharm. et chim.*, (6), IX, p. 424, 1899.

Sur deux réactions nouvelles permettant de différencier les produits des digestions pepsique et pancréatique ; *Ibid.* p. 468.

Remarques relatives à l'action de la chaleur sur la pepsine ; *Ibid.*, X, p. 105, 1899.

Remarques relatives à l'action de la chaleur sur la trypsine ; *Ibid.*, p. 166.

Sur une réaction particulière des produits de digestion papaique, et sur l'action de la chaleur sur la papaïne ; *C. r. Soc. biol.*, (10), VII, p. 112, 1900.

Sur la digestion de la fibrine et de l'albumine par la papaïne, et sur une réaction colorée nouvelle des produits obtenus ; *Journ. pharm. et chim.*, (6), XI, p. 172, 1900.

Remarques relatives à l'action de la chaleur sur la papaïne ; *Ibid.*, p. 268.

La papaïne agit-elle sur la pepsine et la pancréatine, ou bien est-elle détruite par ces ferments ? *Ibid.*, p. 466.

(2) *Journ. pharm. et chim.*, (6), IV, p. 481, 1896.

chaux si elle est acide), doit donner par addition du réactif *Russula* une teinte rouge passant, au bout de quelques heures, au vert olive. Pour plus de sûreté, on peut chloroformer le liquide et attendre 24 ou 36 heures. Cette couleur vire au rouge par l'ammoniaque et redevient verte par l'acide chlorhydrique. Une solution de peptone pancréatique, traitée de même, se colore en rouge, puis en brun-noir, et l'addition d'ammoniaque ou d'acide ne modifie pas cette couleur. On pourra, de plus, à titre de contrôle, essayer l'action de l'eau de brome. Celle-ci, ajoutée peu à peu, ne produit avec les solutions de peptones pepsiques qu'un précipité jaune ; avec les solutions de peptones pancréatiques, elle donne une couleur rouge-violacé intense, passant au brun par un excès de réactif. Finalement la détermination du pouvoir rotatoire pourra également trouver son emploi : les peptones pepsiques médicinales possèdent un pouvoir rotatoire dont la valeur oscille autour de -50° , et les peptones pancréatiques un pouvoir rotatoire voisin de -40° , ou inférieur. L'examen microscopique de la solution fortement concentrée par évaporation montrera de plus de la tyrosine et de la leucine cristallisées, dans le cas des peptones pancréatiques.

Telles sont les conclusions pratiques intéressant le pharmacien. Mais d'autres conclusions peuvent être tirées à un point de vue moins spécial (1). Il se forme par digestion pepsique et papaïque un chromogène spécial, pouvant être digéré par la tyrosine, et donnant, par action du réactif *Russula*, naissance à une matière colorante dont les propriétés sont identiques dans les deux cas. La formation de ce chromogène est parallèle à celle de la tyrosine par digestion trypsique. Des mêmes albuminoïdes d'où dérive le chromogène, peut dériver la tyrosine. Ce chromogène est de nature encore inconnue, mais tout porte à croire qu'il est parent de la tyrosine. En effet, comme la tyrosine, sous l'influence de la tyrosinase, il passe par deux phases d'oxydation dont la première consiste dans la production d'une couleur rouge. Comme cela se passe avec la tyrosine, les réactifs

(1) Je ne parle pas ici de l'action de la chaleur sur les ferments digestifs, ni des actions qu'exercent ceux-ci l'un sur l'autre, non plus que de l'autodigestion de la fibrine. Les conclusions touchant ces questions sont réunies à la fin des chapitres correspondants.

chimiques oxydants n'ont pu remplacer l'action de la tyrosinase, tandis qu'ils remplacent très bien l'action de la laccase sur divers phénols ou dérivés phénoliques, la tyrosine exceptée. Enfin si l'on considère, 1° que les digestions pepsiques, qui ne produisent pas de tyrosine, donnent avec la tyrosinase la coloration verte, et ne donnent pas avec l'eau de brome la réaction du tryptophane, 2° que les digestions papaïques, qui produisent un peu de tyrosine, donnent faiblement la réaction du tryptophane, mais donnent très nettement la réaction verte par la tyrosinase, 3° que les produits des deux digestions précédentes, soumis à la digestion trypsique, donnent de façon intense les réactions de la tyrosine et du tryptophane, on se trouve amené à supposer que le chromogène verdissant est capable de donner, parmi les produits de son dédoublement, de la tyrosine et du tryptophane.

La production du chromogène verdissant établit une analogie entre la pepsine et la papaïne, et éloigne celle-ci de la trypsine. Mais la séparation n'est pas tranchée. On a attribué à la pepsine la faculté d'amener une digestion jusqu'à (?) la phase tyrosine; la papaïne produit peu de tyrosine; la trypsine en produit beaucoup. D'autre part, le premier ferment n'agit qu'en milieu acide, le second agit en milieu légèrement acide, neutre, ou alcalin; le troisième n'agit qu'en milieu neutre ou alcalin. Il y a là une gradation entre les termes de laquelle pourraient s'intercaler peut-être les autres ferments protéolytiques, comme semblent l'indiquer les essais de MM. Bourquelot et Hérissé sur la trypsine des champignons, et les miens sur le ferment du figuier. Peut-on conclure qu'il n'y a qu'un plan pour toute action protéolytique, comme l'ont voulu plusieurs auteurs (Mulder, Diakonow, Stadelmann), plan qui serait suivi même dans la protéolyse par les acides dilués, mais que la marche de l'action se produit, suivant les cas, méthodique et lente, ou bien précipitée à tel point que les différentes phases se confondent? Je me garderai bien de conclure sur de telles questions, avec si peu de données.

Vu, bon à imprimer,
Le Président de la thèse,
EM. BOURQUELOT.

Vu :
Le Directeur de l'École,
L. GUIGNARD.

Vu et permis d'imprimer :
Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,
GRÉARD.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.	1
CHAPITRE PREMIER. — Des produits de digestions pepsiques et pancréatiques des albuminoïdes.....	2
CHAPITRE II. — Le réactif <i>Russula delica</i>	21
CHAPITRE III. — De l'action du réactif <i>Russula delica</i> sur les produits des digestions pepsiques et pancréatiques.....	30
CHAPITRE IV. — De l'action du réactif <i>Russula</i> sur les produits des digestions déterminées par la papaïne. (Application de la tyrosinase à l'étude des ferments protéolytiques végétaux).....	42
CHAPITRE V. — Emploi du réactif <i>Russula</i> pour étudier l'action de la chaleur sur les ferments protéolytiques.	58
CHAPITRE VI. — De l'action qu'exercent l'un sur l'autre les trois ferments protéolytiques : pepsine, trypsine, papaïne.....	70
CHAPITRE VII. — Action de l'eau de brome sur les produits de digestion des albuminoïdes.....	79
CHAPITRE VIII. — Remarques sur l'autodigestion de la fibrine en milieu antiseptique.....	90
CONCLUSIONS	99
